



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

**Estudio preliminar de la amplificación selectiva del
genoma completo (SWGGA) de *Plasmodium vivax* en
muestras de dos áreas endémicas de la Amazonía
peruana**

TESIS

**Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista
Biotecnólogo**

AUTOR

Mac Pholo AGUIRRE HUAMANÍ

ASESORES

Dr. Pablo Sergio RAMÍREZ ROCA

MSc. Paulo César MANRIQUE VALVERDE

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Aguirre, M. (2020). *Estudio preliminar de la amplificación selectiva del genoma completo (SWGA) de Plasmodium vivax en muestras de dos áreas endémicas de la Amazonía peruana*. Tesis para optar el título de Biólogo Genetista Biotecnólogo. Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Hoja de metadatos complementarios

Código ORCID del autor (dato opcional):

0000-0003-4769-6597

Código ORCID del asesor o asesores (dato obligatorio):

0000-0001-9309-7021

DNI del autor:

72179028

Grupo de investigación:

Laboratorio de Malaria – Universidad Peruana Cayetano Heredia

Institución que financia parcial o totalmente la investigación:

Universidad Peruana Cayetano Heredia

Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación. Debe incluir localidades y/o coordenadas geográficas:

Universidad Peruana Cayetano Heredia

12°01'26.3"S 77°03'23.5"W

Año o rango de años que la investigación abarcó:

2018-2019



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO GENETISTA BIOTECNÓLOGO
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

Siendo las 16:15 horas del 20 de febrero de 2020, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo de MAC PHOLO AGUIRRE HUAMANÍ**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 023-EPGB-2019, el titulando expuso su tesis: **"ESTUDIO PRELIMINAR DE LA AMPLIFICACIÓN SELECTIVA DEL GENOMA COMPLETO (SWGA) DE *Plasmodium vivax* EN MUESTRAS DE DOS ÁREAS ENDÉMICAS DE LA AMAZONÍA PERUANA"** y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 19..., calificativo: Aprobado con máximos honores

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** a **MAC PHOLO AGUIRRE HUAMANÍ** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 17:45 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 20 de febrero de 2020.

Dr. JUAN JIMENEZ CHUNGA
(PRESIDENTE)

Dr. PABLO RAMIREZ ROCA
(ASESOR)

Mg. CARMEN PANTIGOSO FLORES
(MIEMBRO)

Blgo. MIGUEL NEIRA GONZALES
(MIEMBRO)

DEDICATORIA

A mis padres, Juana Rosa Huamaní Ramírez y Casiano Aguirre Escalante, por el apoyo constante durante mi etapa universitaria. Gracias por cada día incentivarme a seguir en la carrera, darme una mano en los momentos en que estaba muy cargado de actividades. Este trabajo es muestra de su esfuerzo y perseverancia en mí. ¡Los amo!

A todas/os mis amigas/os de los diferentes laboratorios de la UNMSM en que he estado, considero que todo lo que hemos compartido ha contribuido en mi desarrollo profesional y humano. La lista es inmensa, saben que encontrarme con ustedes me genera alegría y hace recordar las diferentes actividades en que trabajamos. Primero, al Laboratorio de reproducción y biología del desarrollo (Prof. Pino Gaviño) por brindarme la oportunidad de iniciarme en la investigación. Al Laboratorio de microbiología molecular y biotecnología (Dr. Pablo Ramírez) por permitirme entrenarme en el área de la microbiología molecular y sumergirme más en este mundo. A las/os integrantes del Laboratorio de Malaria de la UPCH (Dra. Dionicia Gamboa), durante estos años en el laboratorio he podido aprender de ustedes y he mejorado en mis trabajos. Espero que esta investigación sea de mucha utilidad para los posteriores proyectos.

A mis amigas/os de la UNMSM y en especial a mi promoción de ingreso Genética 2013. Empezamos novatos en esta carrera y tras años de preparación, amanecidas, alegrías, tristezas, hemos mejorado. Sé que falta mucho más y espero que algún momento podamos encontrarnos y recordar todas las experiencias que hemos pasado juntos. A las/os demás chicas/os con los que he podido compartir al menos un poco de tiempo, ya sea en las prácticas, exposiciones, laboratorio o alguna actividad extracurricular. ¡Gracias! Una dedicatoria especial a María, Andrés y Jholy, el grupito con el que casi frecuentemente trabajábamos juntos. A pesar que ahora estemos separados, estamos convencidos que nos encontraremos (primera opción Alemania o alguna parte de Europa, ya saben eh). Los llevaré siempre en el corazoncito, y no se olviden de responderme a los mensajes. ¡Las/os quiero chicas/os!

A Dina, por acompañarme durante este camino, compartir diferentes experiencias, y siempre con el objetivo de fortalecer nuestro proyecto. Espero este esfuerzo te inspire a que sigas mejorando también en tu carrera y desarrollo profesional. A mis amigos/as de los diferentes voluntariados y organizaciones que he colaborado (UNMSM, UPCH, Clubes de Ciencia Perú, REPU, Serendipity, Hamutay, Promotores ambientales del MINAM, Red Interquorum Lima, CMPJ, entre otros). La lista es inmensa, pero, todas/os con un mismo objetivo, contribuir con la sociedad y hacer de este país un lugar mejor. ¡Que sigan los proyectos!

Esta tesis va dedicada para todas las personas que he conocido en estos últimos 8 años.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Dionicia Gamboa del Laboratorio de Malaria de la Universidad Peruana Cayetano Heredia por permitirme realizar la tesis de licenciatura, aún recuerdo la primera vez que respondió a mi correo y luego de conversaciones, después del curso de PCR, aceptó en que forme parte de su grupo de trabajo. Gracias también por cada consejo, regaño, y por las oportunidades de colaborar en algunos proyectos. Son muchas las experiencias que me llevo de su Laboratorio, y espero seguir colaborando en futuros proyectos. Muchas gracias por todo.

A Paulo Manrique por apostar en mí y ser mi mentor (junto con Julio Miranda) desde que entré al laboratorio. Gracias por la paciencia en tus enseñanzas, por mis múltiples preguntas y propuestas (a veces raras) que he realizado para el desarrollo de la tesis. Has sido fundamental en mi formación académica. ¡A por el *paper*!

Agradezco el apoyo económico en la tesis de licenciatura de los fondos de los proyectos: Proyecto “AMAZONIA-International Center of Excellence for Malaria Research” (5U19AI089681, NIH-USA), y al proyecto “Joint project to strengthen research skills on molecular epidemiology and to uncover malaria transmission features relevant for its control in the Peruvian Amazon” (VLIR-UOS project ZEIN2016Z195).

Al Dr. Pablo Ramírez, por aceptar ser mi asesor interno en esta tesis y permitirme seguir en el Laboratorio. Recuerdo la primera vez que tuve una entrevista con usted para poder integrarme en su laboratorio, sinceramente fue una experiencia única el poder plantear mis intereses en hacer investigación con su grupo de trabajo. Muchas gracias por las diversas oportunidades que me ha brindado en colaborar en los proyectos. Mención también a la Dr(c), Ruth García, por acogerme junto con Gustavo y Alejandra, en su proyecto sobre plásmidos.

A todas/os las/os miembros del Laboratorio de Malaria (y las/os que ya no están) por contribuir en mi tesis, además de trabajar juntos en otros proyectos y compartir buenos momentos. Gracias Lidia, Milagros, Anthony, Scarlet, Robertson, Jhonathan, Juanjo, Carlos, Oscar, Pamela, Katherine G., Katherine T., Jason, Jaeson, Norbert, Jeroen, Janani, Jhoel, Bárbara, Pepe, Elizabeth, Berónica, JeanCarlos, Rosa, Yuliza, Edgard, Jorge, Carmen, Karen. También agradecer a los miembros del Laboratorio Satélite en Iquitos por contribuir en los proyectos.

A todas/os las/os miembros y amigas/os del Laboratorio de microbiología molecular y biotecnología en UNMSM por sus consejos y apoyo, por alegrías y las diversas actividades que hemos compartido juntos. Gracias a Gustavo, Wendy, María, Mario, Hederson, Karen, Alejandra, Solis, prof. Fernando.

LISTA DE ABREVIATURAS

- . Ácido desoxirribonucleico (ADN)
- . Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)
- . Ácido ribonucleico ribosomal (rARN)
- . *Buffer* Tris-HCl, EDTA, NaCl (TEN)
- . Ciclo umbral o de cuantificación (Cq)
- . Dodecil Sulfato de Sodio (SDS)
- . Polimorfismo de nucleótido simple (SNP)
- . Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
- . Límite de detección (LOD)
- . Amplificación por desplazamiento múltiple (MDA)
- . Amplificación del genoma completo (WGA)
- . Amplificación selectiva del genoma completo (SWGA)
- . Temperatura de fusión o *melting* (T_m)
- . Albúmina de suero bovino (BSA)
- . Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP)
- . Kilobases (Kb)

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Ciclo biológico de <i>Plasmodium vivax</i>	3
2.2. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	4
2.3. Límite de detección (LOD)	5
2.4. Los microsatélites en el estudio genético en malaria	5
2.5. Métodos de enriquecimiento de ADN	7
2.5.1. Métodos no moleculares.....	7
2.5.1.1. Filtración de leucocitos.....	7
2.5.1.2. Selección híbrida por medio de ARN	9
2.5.1.3. Cultivo ex vivo por corto periodo.....	10
2.5.1.4. Uso de monos esplenectomizados	11
2.5.1.5. Genómica de una sola célula.....	12

2.5.2. Métodos moleculares.....	13
2.5.2.1. Amplificación del genoma completo (WGA)	13
2.5.2.1.1. Amplificación por desplazamiento múltiple (MDA)	13
2.5.2.2. Amplificación Selectiva del Genoma Completo (SWGA)	15
2.5.2.3. Aplicación del SWGA: desde bacteria hasta Plasmodium	18
3. OBJETIVOS.....	21
3.1. Objetivo general.....	21
3.1. Objetivos específicos	21
4. HIPÓTESIS	21
5. MATERIAL Y MÉTODOS	22
5.1. Material biológico	22
5.2. Diseño experimental	22
5.2.1. Etapa 1	22
5.2.2. Etapa 2	23
5.2.3. Etapa 3	24
5.2.4. Etapa 4	24
5.2.5. Etapa 5	24
5.3. Consentimiento ético	24
5.4. Procedimientos de laboratorio	25
5.4.1. Dilución de la muestra referencial	25
5.4.2. Extracción de ADN.....	25
5.4.3. Cuantificación del número de moléculas de ADN del parásito	26

5.4.4. Cuantificación del número de moléculas de ADN humano	26
5.4.5. Amplificación selectiva del genoma completo (SWGA) y dilución de productos del SWGA.....	27
5.4.6. PCR en secuencias microsatélites.....	28
5.4.7. Electroforesis en gel de agarosa	29
5.4.8. Electroforesis capilar y depuración de datos.....	29
5.4.9. Determinación del límite de detección (LOD).....	30
5.4.10. Aplicación en muestras de campo.....	30
5.5. Procedimiento de análisis.....	30
5.5.1. Cálculo de métricas.....	30
5.5.1.1. Número de moléculas de ADN parasitario y humano (moléculas/ μ L)	31
5.5.1.2. Número de moléculas totales de ADN en la reacción SWGA	33
5.5.1.3. Cálculo del incremento del ADN.....	34
5.5.1.4. Conversión del número de moléculas de ADN a nanogramos	35
5.5.1.5. Cálculo del porcentaje de ADN parasitario respecto del total.....	35
5.5.2. Evaluación de la fidelidad del método SWGA.....	35
5.5.3. Selección de las mejores condiciones para el método SWGA.....	36
5.5.4. Plataforma de análisis	36
6. RESULTADOS	37
6.1. Generación del panel de muestras	37
6.2. Optimización del método SWGA.....	38

6.3. Límite de detección (LOD)	43
6.4. Aplicación del método SWGA optimizado en muestras de campo	43
6.4.1. Análisis de la fidelidad del método	43
6.4.2. Incremento de ADN parasitario	46
7. DISCUSIÓN	49
7.1. Optimización del método SWGA	49
7.2. Límite de detección	52
7.3. Fidelidad del SWGA	52
7.4. Aplicación del método SWGA optimizado en ADN de muestras de campo	53
8. CONCLUSIONES	56
9. RECOMENDACIONES	57
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
11. ANEXOS	63
11.1. Marcadores microsatélites	63
11.2. Modificación en los componentes del mix de reacción SWGA y parámetros del SWGA	64
11.2.1. Variación de volumen de enzima: parte 1	64
11.2.2. Variación del volumen de enzima: parte 2 (confirmación)	65
11.2.3. Variación del tiempo de incubación: parte 1	67
11.2.4. Variación del tiempo de incubación: parte 2	68
11.2.5. Variación de la concentración final del set de cebadores pvset1	70
11.2.6. Variación del set de cebadores	71

11.2.7. Variación de la concentración final del set de cebador pvset1920	73
11.2.8. Variación de la concentración final de dNTPs	74
11.2.9. Variación del <i>kit</i> de amplificación genómica.....	76
11.2.10. Comparación de parametros en el <i>kit</i> phi29 New England	77
11.2.11. Comparación de kits de amplificación genómica.....	79
11.2.12. Comparación de rondas de consecutivas y el efecto de la dilución de los productos SWGA	80
11.2.12.1. Juegos de set de cebadores en dos rondas SWGA.....	80
11.2.12.2. Diluciones del producto de la primera ronda SWGA.....	81
11.2.12.3. 1° ronda vs 2° ronda SWGA.....	81
11.2.13. Efecto de la enzima de restricción FspEI	83
11.2.14. Comparación cebadores específicos y no específicos.....	84
11.3. Repetitividad de los ensayos SWGA	86
11.4. Integridad de los productos SWGA.....	87
11.4.1. 20 muestras de campo: 2° ronda SWGA	87
11.4.2. Panel de muestras (simuladas): 1° y 2° ronda SWGA.....	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Plasmodium vivax</i> ..	3
Figura 2. El efecto de la filtración de leucocitos, mediante una matriz de celulosa CF11, en diferentes densidad parasitarias (5 000 y 10 000 parásitos/ μ L) y volúmenes de sangre (1.5 y 3 mL).	7
Figura 3. Desempeño de la metodología Lymphoprep + Plasmodipur en la remoción de células blancas.	8
Figura 4. Preparación de la columna de celulosa CF11 para el filtrado de muestras de sangre.	9
Figura 5. Desempeño del método de selección híbrida por medio ARN en muestras simuladas de ADN parasitario + humano.	10
Figura 6. Disminución del ADN humano utilizando el método de filtración de leucocitos (columnas CF11) y el cultivo ex vivo por un periodo corto.	11
Figura 7. Flujo de trabajo del método de la genómica de una sola.	13
Figura 8. Fundamento de la amplificación por desplazamiento múltiple (MDA).	14
Figura 9. El efecto de la optimización del método de amplificación genómica (WGA) en su desempeño en muestras con diferentes cantidades iniciales de ADN (nanogramos).	15
Figura 10. Procedimiento para la elección del set de cebadores a utilizarse en la amplificación genómica selectiva.	17
Figura 11. Efecto del uso de la enzima de restricción en el desempeño de la amplificación genómica en ADN de <i>Drosophila melanogaster</i> y <i>Wolbachia pipientis</i> .	18
Figura 12. La parasitemia umbral fue de 0.03% (en muestras de sangre en papel filtro) para generar una cobertura de >5x al menos un 50% del genoma de <i>P. falciparum</i> luego de darse el secuenciamiento del genoma completo.	19
Figura 13. Prueba de los set de cebadores pvset1920 y pvset1 en el desempeño del método SWGA.	20

Figura 14. Cuantificación de ADN parasitario en los diferentes protocolos.....	41
Figura 15. Porcentaje final de ADN parasitario (%) en el eje Y; y las muestras, cada una representadas por un color distinto, en el X.	42
Figura 16. Límite de detección (LOD) del método SWGA optimizado.....	43
Figura 17. Fidelidad del SWGA en los 16 marcadores en ADN almacenado (-20°C) de 20 muestras de campo y un ADN fresco del panel de muestras simuladas de ADN (usado como control).	45
Figura 18. Cuantificación del ADN parasitario en ADN almacenado (-20°C) de 20 muestras de campo luego de darse la amplificación genómica.	47
Figura 19. Cuantificación del porcentaje del ADN parasitario en ADN almacenado (-20°C) de 20 muestras de campo luego de darse la amplificación genómica.....	47
Figura 20. Cuantificación de ADN parasitario.....	64
Figura 21. Porcentaje final de ADN parasitario (%) en el eje Y; y las muestras (3, 5, y 8) en el X.....	65
Figura 22. Cuantificación de ADN parasitario.....	66
Figura 23. Porcentaje final de ADN parasitario (%) en el eje Y; y las muestras del 1 al 9, cada una representada por un color distinto, en el X.....	66
Figura 24. Cuantificación de ADN parasitario.....	67
Figura 25. Porcentaje final de ADN parasitario (%) en el eje Y; y las muestras (3, 5, y 8), cada una representada por un color distinto, en el X..	68
Figura 26. Cuantificación de ADN parasitario.....	69
Figura 27. Porcentaje final de ADN parasitario (%) en el eje Y; y las muestras (4 y 7), cada una representada por un color distinto, en el X.	69
Figura 28. Cuantificación de ADN parasitario.....	70
Figura 29. Porcentaje final de ADN parasitario (%) en el eje Y; y las muestras (4 y 7), cada una representada por un color distinto, en el X.	71
Figura 30. Cuantificación de ADN parasitario.....	72

Figura 31. Porcentaje final de ADN parasitario (%) en el eje Y; y las muestras (4 y 7), cada una representada por un color distinto, en el X.	72
Figura 32. Cuantificación de ADN parasitario.	73
Figura 33. Porcentaje final de ADN parasitario (%) en el eje Y; y las muestras (4 y 7), cada una representada por un color distinto, en el X.	74
Figura 34. Cuantificación de ADN parasitario.	75
Figura 35. Porcentaje final de ADN parasitario (%) en el eje Y; y las muestras (4 y 7), cada una representada por un color distinto, en el X.	75
Figura 36. Cuantificación de ADN parasitario.	76
Figura 37. Porcentaje final de ADN parasitario (%) en el eje Y; y las muestras (4 y 7), cada una representada por un color distinto, en el X.	77
Figura 38. Cuantificación de ADN parasitario.	78
Figura 39. Porcentaje final de ADN parasitario (%) en el eje Y; y las muestras (5 y 7), cada una representada por un color distinto, en el X.	78
Figura 40. Cuantificación de ADN parasitario.	79
Figura 41. Porcentaje final de ADN parasitario (%) en el eje Y; y las muestras, cada una representada por un color distinto, en el X.	80
Figura 42. Cuantificación de ADN parasitario.	81
Figura 43. Porcentaje final de ADN parasitario (%) en el eje Y; y las muestras, cada una representada por un color distinto, en el X.	82
Figura 44. Cuantificación de ADN parasitario.	83
Figura 45. Porcentaje final de ADN parasitario (%) en el eje Y; y las muestras (4 y 7), cada una representada por un color distinto, en el X.	84
Figura 46. Cuantificación del ADN parasitario.	85
Figura 47. Porcentaje final de ADN parasitario (%) en el eje Y; y las muestras, cada una representada por un color distinto, en el X.	85

Figura 48. Concentración final de ADN parasitario (moléculas/ μ L) en el eje Y; y las muestras (4 y 7), cada una representada por un color distinto, en el eje X.....	86
Figura 49. Porcentaje final de ADN parasitario (%) en el eje Y; y las muestras (4 y 7), cada una representada por un color distinto, en el X.	87
Figura 50. Corrida electroforética de 5 μ L del producto SWGA de la 2° ronda en 20 muestra reales, más el blanco de reacción (Blan), y el ADN phago Lambda digerido con Hind III (Lad).	87
Figura 51. Corrida electroforética de 5 μ L del producto SWGA de la 1° y 2° ronda en las muestras (4 al 10), más sus respectivos blancos de reacción (B_1 y B_2), y el ADN phago Lambda digerido con Hind III (Lad).	88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Porcentaje de amplificación de los marcadores microsatélites en cada concentración de ADN parasitario.....	6
Tabla 2. Cuantificación de ADN parasitario y humano del panel de muestras simuladas de ADN	38
Tabla 3. Cuantificación de ADN parasitario en los diferentes protocolos.....	41
Tabla 4. Porcentaje final de ADN parasitario en los diferentes protocolos.	42
Tabla 5. Fidelidad del SWGA en los 16 marcadores distribuidos en los cromosomas de <i>P. vivax</i>	45
Tabla 6. Concentraciones y porcentajes de ADN parasitario antes y después de la aplicación del método SWGA optimizado en ADN almacenado (-20°C) de 20 muestras de campo y un ADN fresco del panel de muestras simuladas de ADN (mock sample), usado como control (C-0008).	48
Tabla 7. Marcadores microsatélites utilizados en esta tesis.	63
Tabla 8. Estadístico de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon entre los diferentes grupos para la concentración (moléculas/μL) y porcentaje final de ADN parasitario (%).	65
Tabla 9. Estadístico de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon entre los diferentes grupos para la concentración (moléculas/μL) y porcentaje final de ADN parasitario (%).	67
Tabla 10. Estadístico de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon entre los diferentes grupos para la concentración (moléculas/μL) y porcentaje final de ADN parasitario (%).	68
Tabla 11. Estadístico de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon entre los diferentes grupos para la concentración (moléculas/μL) y porcentaje final de ADN parasitario (%).	70

Tabla 12. Estadístico de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon entre los diferentes grupos para la concentración (moléculas/ μ L) y porcentaje final de ADN parasitario (%).	71
Tabla 13. Estadístico de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon entre los diferentes grupos para la concentración (moléculas/ μ L) y porcentaje final de ADN parasitario (%).	73
Tabla 14. Estadístico de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon entre los diferentes grupos para la concentración (moléculas/ μ L) y porcentaje final de ADN parasitario (%).	74
Tabla 15. Estadístico de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon entre los diferentes grupos para la concentración (moléculas/ μ L) y porcentaje final de ADN parasitario (%).	76
Tabla 16. Estadístico de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon entre los diferentes grupos para la concentración (moléculas/ μ L) y porcentaje final de ADN parasitario (%).	77
Tabla 17. Estadístico de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon entre los diferentes grupos para la concentración (moléculas/ μ L) y porcentaje final de ADN parasitario (%).	79
Tabla 18. Estadístico de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon entre los diferentes grupos para la concentración (moléculas/ μ L) y porcentaje final de ADN parasitario (%).	80
Tabla 19. Estadístico de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon entre los diferentes grupos para la concentración (moléculas/ μ L) y porcentaje final de ADN parasitario (%).	82
Tabla 20. Estadístico de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon entre los diferentes grupos para la concentración (moléculas/ μ L) y porcentaje final de ADN parasitario (%).	82

Tabla 21. Estadístico de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon entre los diferentes grupos para la concentración (moléculas/ μ L) y porcentaje final de ADN parasitario (%).	83
Tabla 22. Estadístico de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon entre los diferentes grupos para la concentración (moléculas/ μ L) y porcentaje final de ADN parasitario (%).	84
Tabla 23. Estadístico de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon entre los diferentes grupos para la concentración (moléculas/ μ L) y porcentaje final de ADN parasitario (%).	86

RESUMEN

La malaria causada por *Plasmodium vivax* es la más predominante en los diferentes casos reportados en el Perú, siendo característico las infecciones asintomáticas y las muestras con baja parasitemia. La poca cantidad de ADN parasitario que se recupera de muestras de baja parasitemia de *P. vivax* (sub-microscópicas) limita la inclusión de esta población parasitaria en estudios de genética y genómica de poblaciones. La subestimación de la diversidad genética sesga el entendimiento de la transmisión de *P. vivax*, especialmente en condiciones de baja endemicidad, donde las infecciones sub-microscópicas son predominantes. Diferentes métodos han sido desarrollados para sobrellevar este problema, siendo la Amplificación selectiva del genoma completo (SWGA) una herramienta promisoría. Sin embargo, su efectividad aún no ha sido reportada en muestras de baja parasitemia de *P. vivax*. El objetivo de la tesis fue optimizar y estandarizar preliminarmente el método SWGA en muestras sub-microscópicas o de baja concentración de ADN de *P. vivax*. Para ello, se modificaron las condiciones del ciclado y componentes del método propuesto por Cowell et al. (2017) para mejorar el enriquecimiento de ADN parasitario, se calculó la cantidad mínima de ADN para una amplificación genómica exitosa, se evaluó la fidelidad del SWGA y se aplicó el método optimizado en ADN almacenado (-20°C) de 20 muestras de campo. Primero se modificaron diferentes componentes y parámetros del método SWGA, se cuantificó el ADN parasitario y humano por PCR tiempo real antes y después de la amplificación genómica; así se calculó el enriquecimiento del ADN parasitario. El método optimizado permitió que las muestras del panel (muestras simuladas) incrementaran su concentración de ADN parasitario (>805 veces) y porcentaje de ADN parasitario (>218 veces) en comparación a su estado inicial. La concentración mínima de ADN parasitario, para generar una amplificación genómica exitosa de más 1200 moléculas/μL, fue 1.29 moléculas/μL. Luego de la aplicación del método SWGA optimizado, el 97.22% de todos los alelos no presentaron diferencias en sus tamaños y solo hubo una pérdida de datos del 3.57%. El 80% de la muestras de campo tuvieron una amplificación genómica exitosa. Se demostró que el método optimizado mejoró su desempeño en el enriquecimiento del ADN de *P. vivax* a partir de ADN total, provenientes de muestras de baja densidad parasitaria, y así permitió una mayor cobertura de las muestras para ser incluidas en los análisis genéticos.

Palabra claves: Amplificación por desplazamiento múltiple, enriquecimiento de ADN parasitario, límite de detección, fidelidad del SWGA, baja densidad parasitaria.

ABSTRACT

Malaria caused by *Plasmodium vivax* is the most predominant in the different cases reported in Peru, being characteristic the asymptomatic infections and the samples with low parasitemia. The low recovery of parasite DNA in low parasitemia samples of *P. vivax* (sub-microscopic) restricts the inclusion of these samples in population genetic and genomic studies. The under-estimation of the genetic diversity biases the understanding of *P. vivax* transmission especially in low endemic settings where submicroscopic infections are predominant. Different methods have been developed to overcome this problem, being the Selective Whole Genome Amplification (SWGA) one of the most promissory tools. However, its effectiveness in low parasite density *P. vivax* infections has not been reported yet. This work aims to optimize and standardize in a preliminary way the SWGA method in sub-microscopic samples or low parasite DNA concentration. Therefore, cycling conditions and components of the method proposed by Cowell et al. (2017) were modified to improve the parasite DNA enrichment, the minimum amount of DNA for successful genomic amplification was measured, SWGA fidelity was evaluated and the optimized method was applied in frozen DNA (-20°C) of 20 field samples. First, changes of the different components and parameters of the method SWGA were made, the parasite and human DNA were quantified by real-time PCR before and after the genomic amplification; thus the enrichment of parasite DNA was measured. The optimized method allowed that sample panel (mock samples) increase their parasite DNA concentration (>805 fold) and parasite DNA percentage (>218 fold) comparing to their initial state. The minimum concentration of parasite DNA, to generate successful genomic amplification of more than 1200 molecules/μL, was 1.29 molecules/μL. After the application of the SWGA optimized method, the 97.22% of all alleles did not show differences in their length and there was only a loss of data of 3.57%. The 80% of the field samples had a successful genomic amplification. It was shown that the optimized method improved its performance in the enrichment of *P. vivax* DNA from total DNA, in low parasite density samples, and thus allowed greater coverage of the samples to be included the genetic analyzes.

Keywords: Multiple-displacement amplification, parasite DNA enrichment, limit of detection, fidelity of SWGA, low density of parasites.

1. INTRODUCCIÓN

Estudiar la diversidad genética de las poblaciones de *Plasmodium vivax* nos permite conocer mejor sobre la epidemiología y distribución de los parásitos, y contribuye a que se mejoren los programas de control y eliminación de la malaria (Arnott et al. 2012), más aún en zonas donde la mayoría de las infecciones son sub-microscópicas. Por otro lado, se puede también determinar si ciertos genotipos circulantes en la población corresponden a cepas importadas o propias de la zona (Delgado-ratto et al. 2016); sin embargo, para realizar todo lo anterior, primero es necesario disponer de suficiente ADN parasitario que permita la generación de información útil y no sesgada.

Estudios basados en PCR han determinado que más del 50% de las infecciones causadas por *Plasmodium vivax* poseen cargas parasitarias inferiores a 10 parásitos/ μ L de sangre (Carrasco-Escobar et al. 2017). En muestras con parasitemias de 1% (equivalente a 40 000 parásitos/ μ L de sangre) hay la presencia de 5 a 10 veces más parásitos que células blancas; pero, como el tamaño del genoma humano equivale al de 200 genomas parasitarios, la proporción de ADN parasitario respecto al ADN humano siempre es menor (Auburn et al. 2011). Esta relación ADN parasitario/ADN humano es mucho menor en muestras con densidades por debajo de 10 parásitos/ μ L, por lo que la cantidad de ADN parasitario sería muy baja y casi indetectable con algunas técnicas moleculares. Esta limitante en la cantidad de ADN parasitario es un obstáculo en los estudios de diagnóstico (Lo et al. 2015) y genética de poblaciones (Manrique, 2018), y en consecuencia se genera una limitada información de la población de baja densidad de parásitos.

Debido al problema que genera la enorme presencia del ADN humano, se han desarrollado métodos que permiten trabajar solo con el ADN de interés, por ejemplo, la filtración de leucocitos (WWARN procedure, 2011) y el tamizaje de células (Nair et al. 2014). Sin embargo, estos métodos poseen ciertas desventajas, tales como la exigencia de un volumen mínimo de sangre total de 2 mL o la necesidad de equipos especializados

que separen grupos celulares específicos. Estas técnicas no se podrían utilizar para grandes cantidades de muestras, ya que todo el proceso, desde la obtención de ADN hasta su análisis, sería mucho más laborioso y costoso. Ante estos inconvenientes, se ha desarrollado un método que trabaja solo con el ADN total, cuyo proceso se asemeja en parte a un PCR convencional, y en donde se generan múltiples copias del genoma parasitario. Este método, llamado Amplificación Selectiva del Genoma Completo (SWGA por sus siglas en inglés) y desarrollado inicialmente para ADN de bacterias (Leichty et al. 2014), fue implementado por Cowell et al. (2017) para muestras de alta parasitemia de *Plasmodium vivax* (>2572 parásitos/μL) con el objetivo de enriquecer su ADN y que sean útiles para el secuenciamiento del genoma completo. Así lograron incrementar el número de *reads* que mapeaban el genoma de referencia de *Plasmodium vivax* y la cobertura del genoma mejoró al momento de secuenciar el genoma completo de este parásito.

Pese a que se implementó un método para enriquecer el ADN del parásito a partir del ADN total, solo se ha evaluado su desempeño en muestras con alta densidad parasitaria (>2572 parásitos/μL) y no se ha probado en ADN de muestras con bajas densidades parasitarias (<10 parásitos/μL), que son comunes en nuestra Amazonía. El presente trabajo ha tenido como objetivo estandarizar y optimizar el método SWGA en ADN de *Plasmodium vivax* provenientes de muestras con baja densidad parasitaria o contenido de ADN parasitario. Esto incluyó la modificación de las condiciones del ciclado y componentes del método SWGA para optimizar su rendimiento. Luego se analizó la fidelidad del método mediante el uso de 16 marcadores microsatélites; se determinó la cantidad mínima de ADN parasitario para obtener un enriquecimiento de ADN parasitario exitoso y finalmente se aplicó el método SWGA optimizado en 20 muestras de campo. Los resultados de este trabajo permitirán ver el desempeño del método SWGA en ADN de muestras de baja densidad parasitaria de *P. vivax*, además que permitirá *que* esta población parasitaria sea incluida en los estudios genéticos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Ciclo biológico de *Plasmodium vivax*

El ciclo de *Plasmodium* involucra dos etapas claves, una se desarrolla en el mosquito hembra *Anopheles* y la otra en el humano, dentro este último se tiene la fase exoeritrocítica, eritrocítica, y de gametocitos (Figura 1). En la fase eritrocítica los parásitos invaden los glóbulos rojos, se multiplican de manera asexual y se liberan para luego infectar otros glóbulos, generándose así un ciclo continuo y que es el causante de los síntomas en el humano (Mueller et al. 2009). Cuando se toma una muestra de sangre del humano, se capturan parásitos del estadio eritrocítico y gametocito, al extraer su ADN se obtiene el genoma haploide y con este se pueden realizar estudios genéticos como de diagnóstico (Mangold et al. 2005) y genética poblacional (Delgado-Ratto et al. 2016).

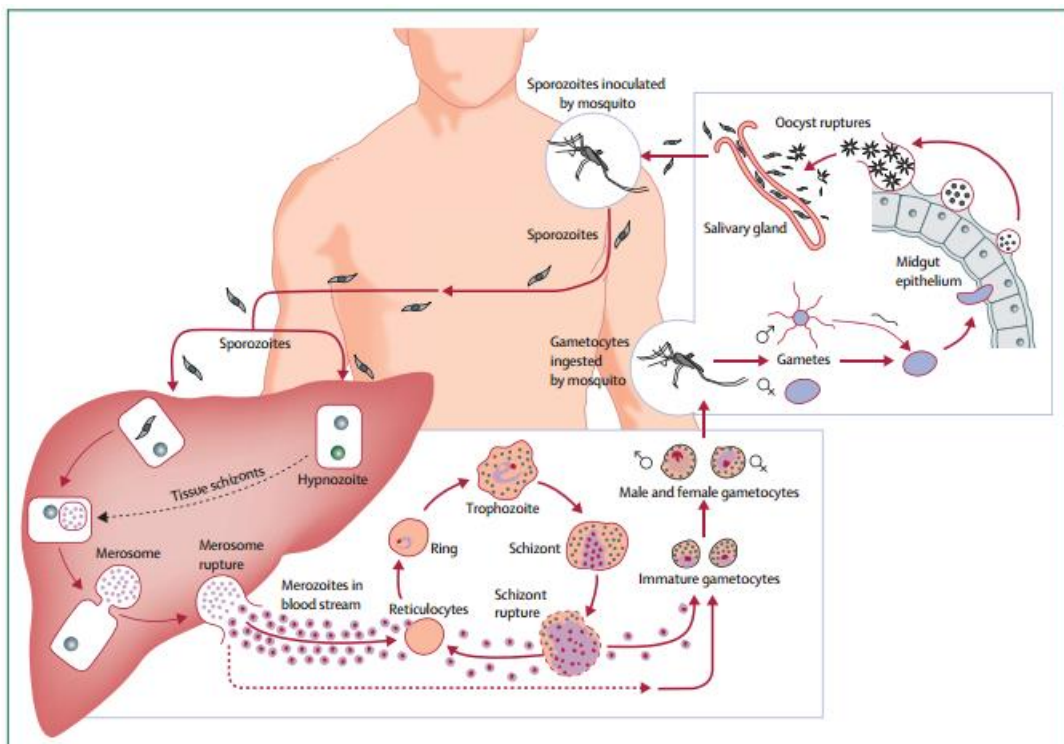


Figura 1. Ciclo biológico de *Plasmodium vivax*. Se divide claramente las etapas dentro del humano y mosquito, dentro de cada uno de ellos el parásito va cambiando de estadio. Fuente: Mueller et al. (2009).

2.2. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

El PCR tiempo real es un método molecular que constantemente mide la amplificación de una cierta cantidad de moléculas de ADN (tiempo real). La detección del nuevo ADN se da por dos métodos comúnmente usados, colorantes fluorescentes no específicos (Wittwer et al. 1997) y las sondas específicas de una secuencia (Holland et al. 1991). En el primer caso, el colorante más costo/efectivo usado es el SYBR Green, el cual se une a ADN doble cadena, y en este estado se incrementa su fluorescencia en comparación del SYBR Green libre. La única desventaja de este colorante es que se une a cualquier ADN doble cadena, el cual puede ser el producto PCR deseado o uno inespecífico. El producto deseado se puede determinar por medio del análisis de la temperatura de fusión (T_m de *melting temperature*), esta temperatura es específica para cada fragmento de ADN amplificado y esto evita la necesidad de realizar la verificación por electroforesis.

Durante la fase exponencial de la amplificación, el número de moléculas amplificadas es proporcional a la cantidad que existía inicialmente; en base al valor del ciclo de cuantificación o “ C_q ” es que se determina el número de moléculas de una secuencia nucleotídica. Es así que se tiene un valor de C_q cuando la fluorescencia es mucho mayor al nivel de ruido o *background*; si la concentración inicial es alta, el C_q es alcanzado en un ciclo de amplificación más temprano (Heid et al. 1996). La determinación de la cantidad del ADN blanco se estima en base a una curva de calibración construida con muestras estándar diluidas en serie. Esta estaría representada por la siguiente fórmula:

$$C_q = b + a * \log[\text{concentración}]$$

Donde:

“ a ” representa el incremento del C_q respecto a una unidad de logaritmo de la concentración de ADN y “ b ” es el C_q que se obtiene cuando solo una copia es teóricamente detectada.

Si la eficiencia de la reacción es del 100%, el número de moléculas de ADN se duplicaría en cada ciclo, teóricamente. Sin embargo, no siempre se dará lo ideal, por lo que la amplificación se da en base a la siguiente fórmula (Kralik et al. 2017):

$$N_n = N_0 * (1 + E)^n$$

Donde:

“ N_n ” es el número de moléculas luego de n ciclos y “ N_0 ” es el número inicial de copias.

“ E ” es la eficiencia del PCR (oscilando entre valores de 0 a 1) y “ n ” el número de ciclos.

2.3. Límite de detección (LOD)

El LOD (por sus siglas en inglés de *Limit of Detection*) es definido como la cantidad mínima de analito que es detectado con un porcentaje de confianza, pero no necesariamente cuantificada como valor exacto. Otra definición describe al LOD como la mínima concentración a ser considerada como diferente a una muestra blanco con cierto nivel de confianza (Laboratory services section - Austin). El valor del LOD también es muy importante en estudios donde se analiza la presencia de organismos genéticamente modificados (GMO por sus siglas en inglés). Broeders et al. (2014) hacen una revisión sobre lo que se debe tener en cuenta para la validación de estudios en donde se utilicen métodos de detección de GMO, además que citan cómo se debe llevar a cabo los análisis del LOD_6 y LOD_{95} .

2.4. Los microsatélites en el estudio genético en malaria

Los microsatélites son marcadores neutrales compuestos de repeticiones de nucleótidos en tándem distribuidos en el genoma. No tienen ningún tipo de presión de selección y son polimórficos, esta variabilidad hace que sean una buena alternativa para estudios genéticos (Goldstein y Schlotterer, 1999). Los microsatélites se pueden utilizar para el estudio de genética de poblaciones de organismos causantes de enfermedades,

para el caso de malaria se han utilizado dicho marcadores para caracterizar las poblaciones circulantes de *P. falciparum* (Baldeviano et al. 2015) y *P. vivax* en Perú (Delgado-Ratto et al. 2016; Manrique, 2018). También es posible estudiar eventos evolutivos recientes en sub-poblaciones de una misma especie o sus relacionadas (Schlötterer, 2001). A pesar de ser una buena herramienta, la correcta amplificación de estos marcadores se ven afectadas por la baja concentración de ADN parasitario. En el trabajo de Manrique (2018) se reportan porcentajes de amplificación por encima de 64% (promedio 73%) y 40% (promedio 57%) a partir de muestras con concentraciones de ADN parasitario de 1.5 - 8 moléculas/ μ L y 0.8 – 1.5 moléculas/ μ L, respectivamente (Tabla 1). Ninguna muestra por debajo de 0.8 moléculas/ μ L tuvo un éxito de amplificación mayor a 40% del total de marcadores. Este mismo problema sucedería con otros tipos de marcadores o incluso si se deseara secuenciar el genoma completo, por lo cual es necesario desarrollar métodos para disminuir el ADN humano contaminante y enriquecer el ADN parasitario.

Tabla 1. Porcentaje de amplificación de los marcadores microsatélites en cada concentración de ADN parasitario. Fuente: Manrique, 2018.

Categoría de Parasitemia	N	% amplificación MZN	% amplificación Global
> 8 mol/uL (Cq < 28.61)	93/251	98.12 % (min = 96.80%)	99.05 % (min = 98.01%)
4 – 8 mol/uL (28.65 < Cq < 31.5)	68/203	73.40 % (min = 64.20%)	82.80 % (min = 73.90%)
1.5 – 4 mol/uL (31.5 < Cq < 32.91)	41/140	77.10 % (min = 63.40%)	77.80 % (min = 69.10%)
0.8 – 1.5 mol/uL (Cq < 34.07)	56/98	56.80 % (min = 39.60%)	59.60 % (min = 44.20%)

2.5. Métodos de enriquecimiento de ADN

2.5.1. Métodos no moleculares

2.5.1.1. Filtración de leucocitos

Existen diversos métodos para enriquecer el ADN genómico de *Plasmodium*, uno de ellos implica remover los leucocitos de la sangre total, que además son fuente de ADN humano. Este método se basa en el uso de columnas de celulosa CF11, que tendrían la capacidad de atrapar a los leucocitos por medio de su tamaño e interacción con los grupos hidroxilos de la celulosa y moléculas de superficie de la célula (Venkatesan et al. 2012). En este mismo artículo se indicó que mediante el uso de la filtración de leucocitos en muestras de *P. falciparum* con un volumen de sangre de 3 mL y densidad de 10 000 parásitos/ μ L se obtuvo menos del 30% de presencia de ADN humano y más de 500 ng de ADN total. Para la misma densidad (10 000 parásitos/ μ L) y con un volumen de sangre de 1.5 mL, se obtuvo 28% de presencia de ADN humano y 510 ng de ADN total; en densidades de 5000 parásitos/ μ L y con un volumen de 3 mL, se vio que el ADN humano llegó a 77% (Figura 2). Estos resultados mostraron que reduciendo el volumen de sangre o densidad parasitaria se obtuvo más presencia del ADN humano en el ADN total.

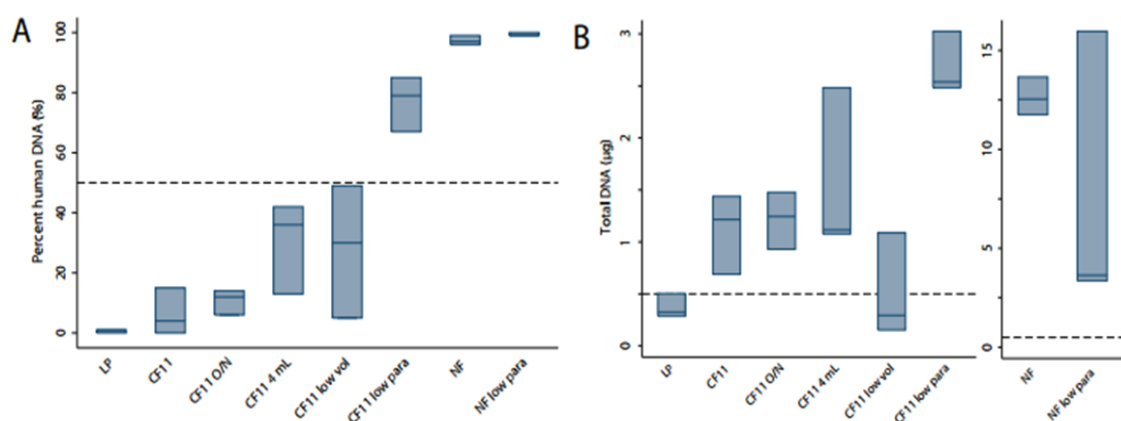


Figura 2. El efecto de la filtración de leucocitos, mediante una matriz de celulosa CF11, en diferentes densidades parasitarias (5 000 y 10 000 parásitos/ μ L) y volúmenes de sangre (1.5 y 3 mL). Fuente: Venkatesan et al. (2012).

Por otro lado, en el trabajo de Auburn et al. (2011) se utilizaron 4 métodos de remoción de leucocitos, de los cuales el método de Lymphoprep + Plasmodipur mostró mejores resultados, obteniendo menos del 30% de ADN humano en más del 70% de las 76 muestras analizadas (Figura 3).

Si bien en los dos trabajos anteriores no se indicó la posterior aplicación de las muestras para estudios de genética de poblaciones, es en el trabajo de Pearson et al. (2016) en donde se muestra la utilidad de las muestras luego de someterse a la filtración de leucocitos. Pearson et al. (2016) utilizaron solo las muestras que fueran tipificables en más del 80% de los 303 616 SNP de alta calidad, llegando solo a trabajar con 148 muestras de 292 (casi un 50% de muestras perdidas).

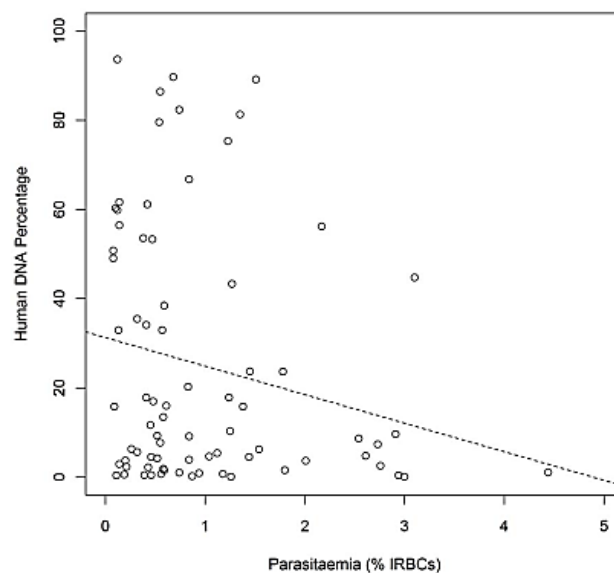


Figura 3. Desempeño de la metodología Lymphoprep + Plasmodipur en la remoción de células blancas. El porcentaje de ADN humano en el eje Y, parasitemias en el eje X. Fuente: Auburn et al. (2011).

Una de las principales limitantes al utilizar estas metodologías de remoción de leucocitos, anteriormente mencionadas, recae en la necesidad de trabajar con un volumen inicial de sangre (> 2mL) previo a extraer el ADN (WWARN procedure, 2011; Figura 4). Esto no hace factible su aplicación en ciertos estudios debido a que la muestra de sangre está en papel filtro o incluso solo se dispone del ADN total. Además de no ser

costo/efectivo para su aplicación a grandes cantidades de muestras ya que generaría un tiempo extra a todo el proceso.

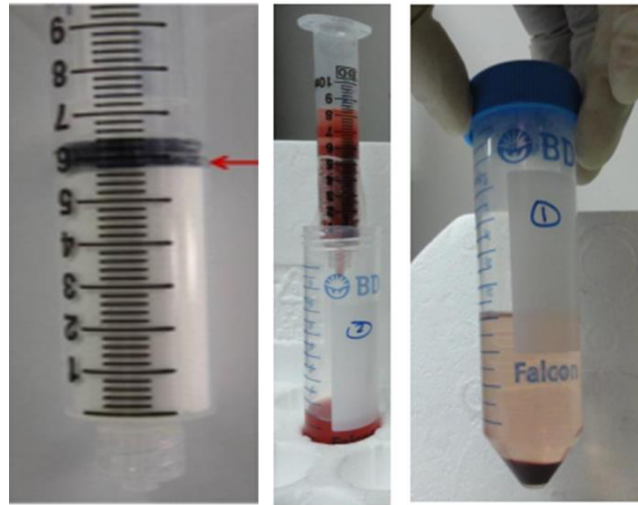


Figura 4. Preparación de la columna de celulosa CF11 para el filtrado de muestras de sangre. Nótese la necesidad de usar un volumen de sangre mayor a 2mL. Fuente: WWARN Procedure, 2011.

2.5.1.2. Selección híbrida por medio de ARN

Otro método molecular implica el uso de sondas de ARN para captar el ADN. Las sondas biotiniladas de ARN, que son complementarias al genoma del patógeno, son hibridadas con el ADN en una solución y extraídas con perlas recubiertas con estreptavidina magnética. El ADN del huésped es retirado y el del patógeno es luego recuperado y utilizado para posteriores análisis (Melnikov et al. 2011). Bright et al. (2012) aplican esta metodología para capturar ADN de *P. vivax* a partir de ADN total (parásito más humano) sin la necesidad de utilizar la técnica de filtración de leucocitos, logrando a partir de una muestra con 0.5% de porcentaje inicial de ADN parasitario, generar un porcentaje final de 55% (Figura 5). Luego de secuenciar el genoma, obtuvieron una cobertura mayor a 5x en el 93% del genoma de *P. vivax*, las cuales fueron similares a lo que obtuvieron con el método de filtración de leucocitos (> 5x de cobertura en 96% del genoma).

En el trabajo de Bright et al. (2012) se enfatizó que, tanto la filtración de leucocitos como el método de captura de ADN, generaron similares porcentajes finales de ADN

parasitario; sin embargo, el segundo método tuvo un costo adicional de 100 dólares debido a la preparación de librerías. A pesar de este dinero extra, fue compensado con lo que no se hizo al inicio de la toma de muestra, en donde fue necesario un volumen de sangre inicial, filtrarlo en el lugar y aplicar el método a todas las muestras, ya que no se sabe cuánto ADN se obtendría luego de procesarlas.

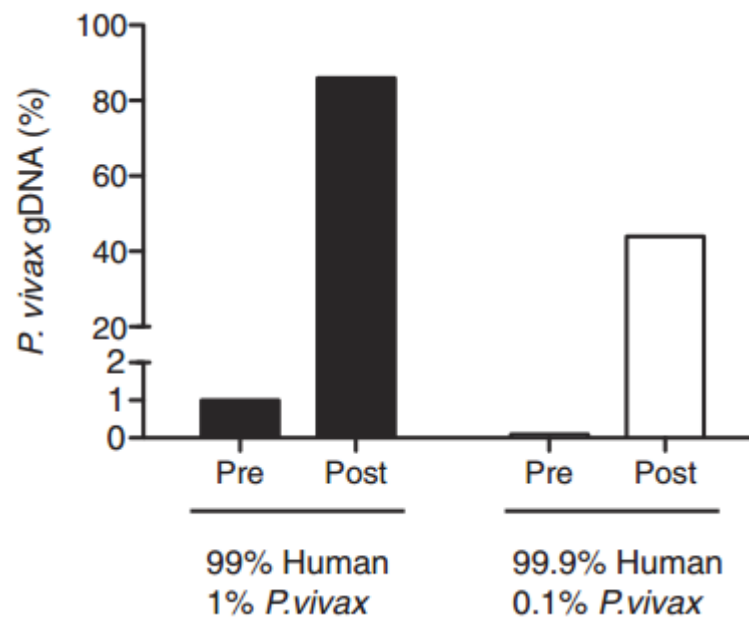


Figura 5. Desempeño del método de selección híbrida por medio ARN en muestras simuladas de ADN parasitario + humano. Fuente: Bright et al. (2012).

2.5.1.3. Cultivo *ex vivo* por corto periodo

Si bien no existe cultivo *in vitro* para mantener por largos periodos las cepas de *P. vivax*, es posible hacer un cultivo *ex vivo* por corto tiempo con el fin de madurar los parásitos y que lleguen al estadio de esquizogonia; así la cantidad de parásitos es mayor respecto al inicial y se puede obtener mayor ADN parasitario. Auburn et al. (2013) evaluaron la eficacia de dos métodos para la disminución de ADN humano, la filtración de leucocitos por columna CF11 y este mismo método más la maduración del parásito en cultivo *ex vivo* por periodo corto. Se observó que someterse solo a filtración se redujo la presencia de ADN humano hasta 54.6% y luego de someterse al cultivo *ex vivo* se llegó a 38.1% (la muestra inicial sin tratamiento fue de 95.2% de ADN humano); utilizando otro tipo de

muestra, se redujo de 33.9% a 4.31% (Figura 6). La cantidad de ADN parasitario se incrementó cuando se utilizó el cultivo por periodo corto, para el primer tipo de muestra se obtuvo 2.00 ng de ADN de *P. vivax* por microlitro de glóbulos rojos (muestra inicial = 1.29 ng/μL) y para el segundo, 5.33 ng/μL (muestra inicial = 0.15 ng/μL). Si bien esta metodología fue útil para disminuir el ADN humano, implicó la inversión de materiales como medio de cultivo, incubadoras y tiempo de incubación de aproximadamente 40-48 horas. Su aplicación no sería factible para grandes cantidades de muestras.

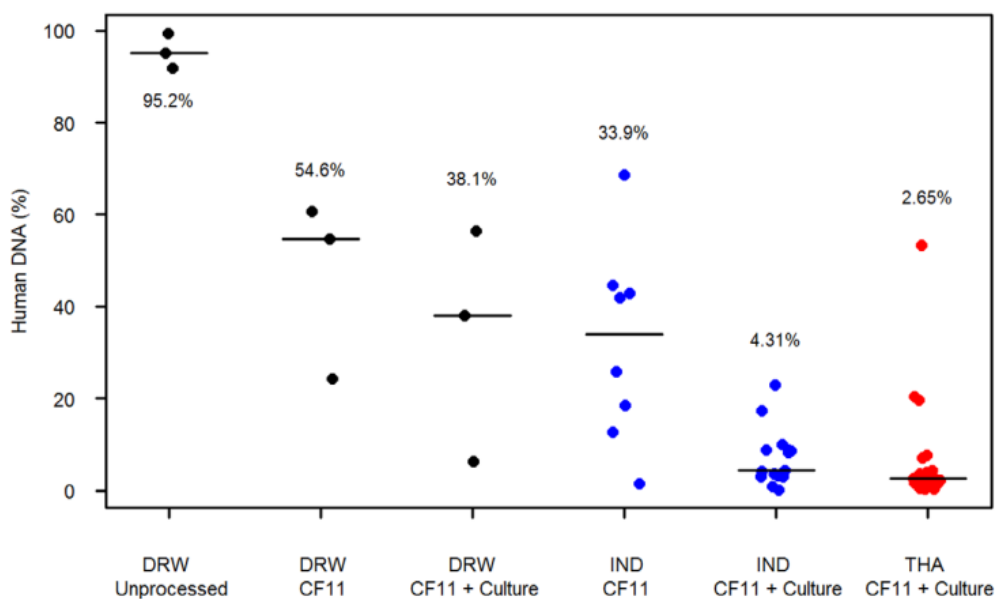


Figura 6. Disminución del ADN humano utilizando el método de filtración de leucocitos (columnas CF11) y el cultivo ex vivo por un periodo corto. Métodos aplicados en cada muestra en el eje X y el porcentaje de ADN humano en el eje Y. Fuente: Auburn et al. (2013).

2.5.1.4. Uso de monos esplenectomizados

El bazo tiene una importante función en la inmunología, ya que es el lugar donde se da la interacción entre los antígenos y las células del sistema inmunológico. Se ha observado que aquellos monos sin bazo (monos esplenectomizados) han sido más susceptibles a malaria respecto a los que sí lo tenían, mostrando que el bazo tendría un rol importante en la enfermedad (Kreier, 1980). Los primates de los géneros *Saimiri* y *Aotus* son los modelos animales recomendados por la OMS para estudios en malaria (WHO, 2004). Si bien en los trabajos de malaria, que utilizaron los monos

esplenectomizados, no fue el objetivo el evaluar qué tanto se enriqueció el ADN parasitario o disminuyó el ADN humano, Carlton et al. (2008) analizaron y compararon los genomas de las especies de *Plasmodium vivax*, *P. knowlesi*, y *P. yoelii* con el objetivo de conocer más de sus características biológicas. Una clara desventaja de usar esta metodología sería las consideraciones éticas de trabajar con animales, el mantenimiento de los animales de laboratorio, y la inviabilidad de aplicarlo para varias muestras.

2.5.1.5. Genómica de una sola célula

La genómica de una célula permite separar grupos celulares y analizar su composición, ya sea el análisis del ADN, ARN y/o proteínas. Para el caso de malaria, implica la captura de un único glóbulo rojo infectado, extraer el ADN, la amplificación del genoma completo, secuenciar el genoma y su posterior genotipificación. La separación de células se puede dar por fluorescencia o el uso de anticuerpos, puede aplicarse a cualquier tipo de muestra de sangre, sean frescas o congeladas. En el trabajo de Nair et al. (2014) se utilizaron colorantes que penetraban la célula, sin previa permeabilización o fijación, y que no se unían covalentemente al ADN. La correcta separación de los grupos celulares (infectados y no infectados) fue confirmada por medio de la tinción Giemsa de ambos grupos celulares, observándose que el grupo considerado como infectados sí presentaba tinción de los parásitos; no se observó lo mismo en el otro grupo (Figura 7). Luego se aisló una célula, se procedió a la lisis y al aislamiento del ADN, a la que posteriormente se aplicó la amplificación del genoma completo y se secuenció todo el genoma. Obtuvieron una cobertura mayor a 10X para un promedio del 32.4% del genoma en 11 muestras de *Plasmodium vivax*, en *Plasmodium falciparum* fue un promedio de 51.1% con la misma cobertura. Una de las desventajas de este método recaería en la necesidad de utilizar un equipo especializado para separar y analizar solo una célula proveniente de solo una muestra, lo que no permitiría su aplicación para una mayor cantidad de muestras ni para aquellas en donde

solo se tiene el ADN. Por otro lado, también se indica que hay un riesgo de capturar ADN que estuviese libre en los cultivos celulares o muestras de sangre, o incluso ADN por contaminación en el proceso de la manipulación (Nair et al. 2014).

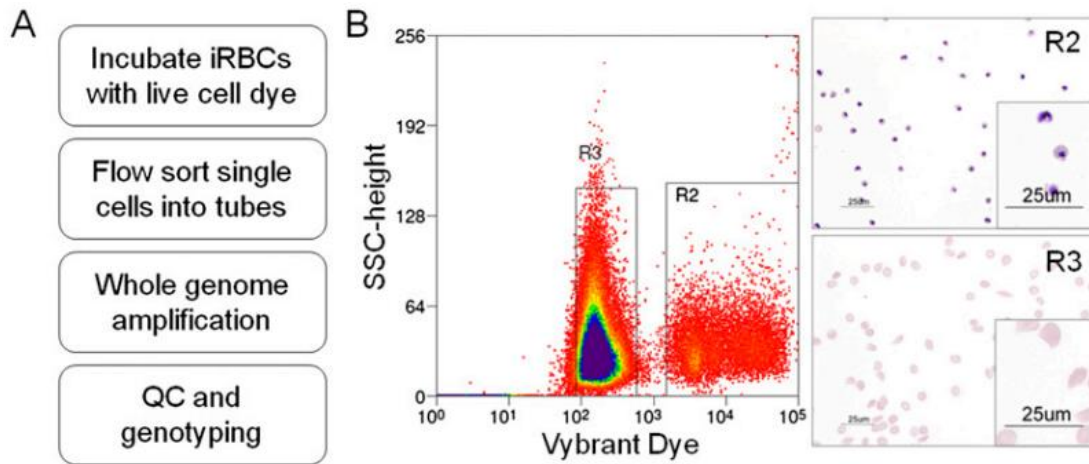


Figura 7. Flujo de trabajo del método de la genómica de una sola. La separación de los grupos celulares se dio por la intensidad del colorante, la posterior corroboración de las células infectadas (R2) se dio mediante la tinción Giemsa. Fuente: Nair et al. (2014).

2.5.2. Métodos moleculares

2.5.2.1. Amplificación del genoma completo (WGA)

2.5.2.1.1. Amplificación por desplazamiento múltiple (MDA)

Este método molecular se basa en el uso de la enzima phi29 polimerasa y cebadores aleatorios, quienes se unen a la hebra de ADN y la polimerasa empieza a sintetizar la nueva cadena de ADN (Figura 8). En el momento que la enzima se encuentra con la otra doble cadena, la separa y los sitios de unión a cebadores queden expuestos. Esto permite que empiece una nueva síntesis a partir de la cadena libre y en consecuencia se generan múltiples copias de ADN de manera simultánea (Figura 8), pudiendo producir hasta microgramos de ADN.

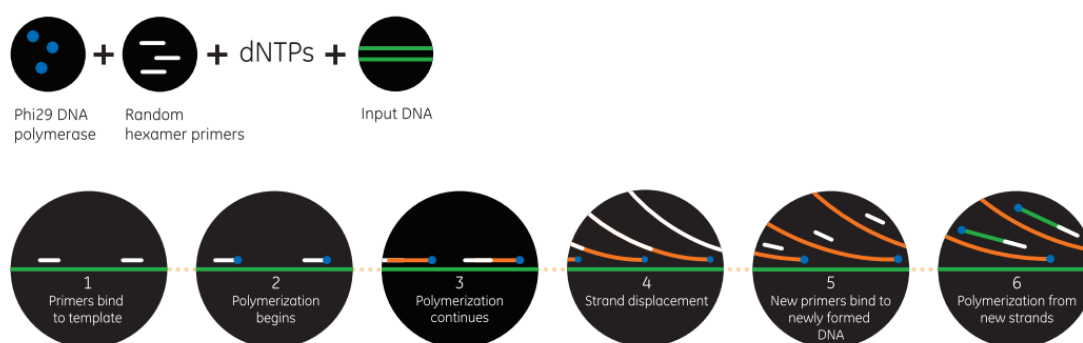


Figura 8. Fundamento de la amplificación por desplazamiento múltiple (MDA). Fuente: ilustra™ nucleic acid amplification (www.gelifesciences.com).

La enzima phi29 ADN polimerasa tiene una tasa de error de 1 en 10^6 - 10^7 , el cual es 100 veces menor al de la *Taq* polimerasa (tasa de error = 3 en 10^4). Se caracteriza por ser termosensible, haciendo que se desnaturalice a altas temperaturas. Posee actividad exonucleasa 3'-5' la cual le permite corregir errores en la síntesis de la nueva cadena (Garmendia et al. 1992) y una de sus subunidades, la TPR2, es la encargada de separar la doble cadena de ADN (Rodríguez et al. 2005). Esta última característica es muy útil ya que no es necesario recurrir a cambios de temperatura para separar la doble hebra y permite que la reacción ocurra a temperatura constante. Debido a la actividad exonucleasa 3'-5' de la enzima, los cebadores son susceptibles a la degradación y necesitan una modificación química en el enlace fosfodiéster, sustituyendo un oxígeno por un azufre, así obteniendo un enlace fosforotioato que le otorga protección ante una exonucleasa 3'-5' (Skerra et al. 1992).

La aplicación de la amplificación del genoma completo (WGA por sus siglas en inglés) se ha dado en diversos organismos (Leichty et al. 2014) y en los últimos años se ha aplicado a malaria. Oyola et al. (2014) trabajaron con la especie de *Plasmodium falciparum*, aplicando el método de amplificación del genoma completo con ciertas variaciones en su protocolo. En dicho trabajo se incorporó cloruro de tetrametilamonio en los *buffers* del *kit* de amplificación genómica con el fin de mejorar su desempeño, incrementar el porcentaje de *reads* mapeados al genoma del parásito y la cobertura de

regiones ricas en Adenina y Timina, característicos del genoma de *P. falciparum*, al momento de secuenciarlas (Figura 9). Solo trabajaron con ADN provenientes de cultivos celulares (un gran porcentaje del ADN total inicial provenía solo de *P. falciparum*), mas no de muestras de campo, así obteniendo una cobertura del 99.8% del genoma a partir una cantidad de ADN equivalente a < 400 genomas del parásito. A pesar que aplicar el método WGA generó datos útiles en muestras de cultivo, su rendimiento no fue el mismo para muestras de campo, las cuales contenían inicialmente un mayor porcentaje de ADN humano.

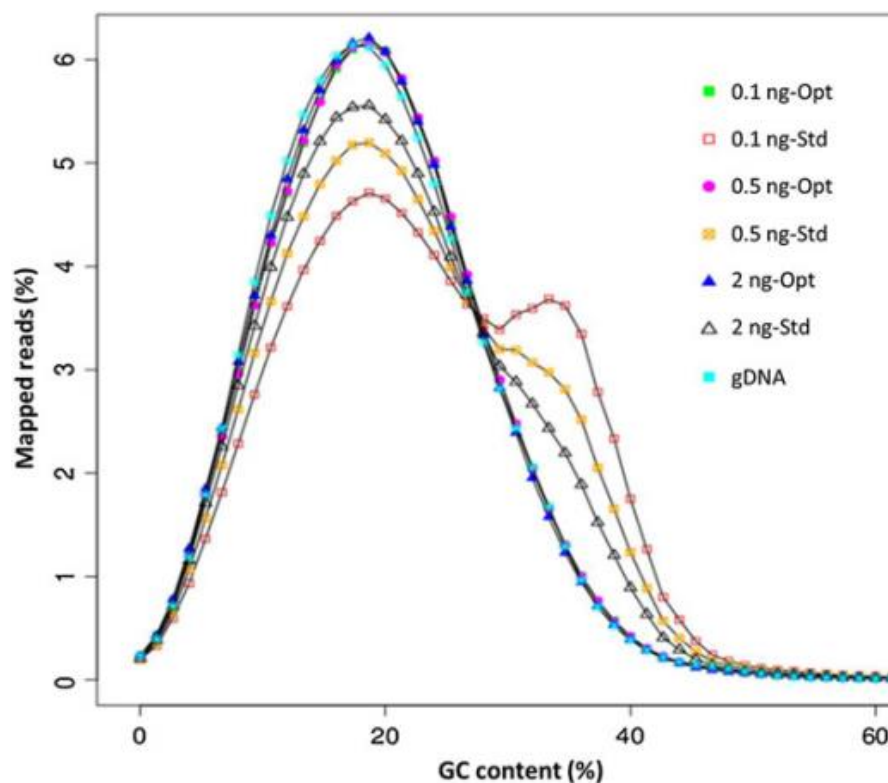


Figura 9. El efecto de la optimización del método de amplificación genómica (WGA) en su desempeño en muestras con diferentes cantidades iniciales de ADN (nanogramos). Opt = adición del cloruro de tetrametilamonio, Std = método original sin modificaciones. Fuente: Oyola et al. (2014).

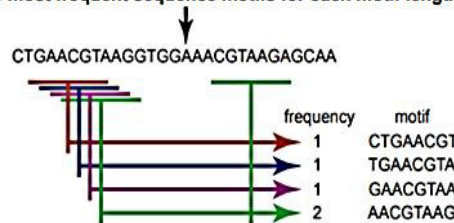
2.5.2.2. Amplificación Selectiva del Genoma Completo (SWGA)

Posee el mismo fundamento que el WGA con la diferencia que en el SWGA se utilizan cebadores diseñados para que se unan con mayor frecuencia al ADN de interés y con menor frecuencia al ADN contaminante. Para el diseño de estos cebadores pasan por

todo un análisis bioinformático, primero se analizan los genomas que estarían presentes en el ADN total: el genoma de interés y contaminante. Estos cebadores deben unirse a las secuencias motivo de ADN que son comunes en el genoma de interés y raros en el ADN contaminante (Leichty et al. 2014, Sundararaman et al. 2016). Estas son secuencias cortas de 8 a 12 nucleótidos que se encuentran distribuidos en todo el genoma y para elegir aquellas idóneas se deben encontrar las más frecuentes en el genoma de interés y las menos frecuentes en el contaminante (no implica que solo se use una secuencia motivo). Una vez definido se diseñan los cebadores, que pueden ser miles, y se emplean diversos filtros como evitar la formación de homodímeros y heterodímeros entre los cebadores, temperaturas de fusión similares, que se hibriden con mayor frecuencia al genoma de interés y con menor frecuencia al contaminante, entre otros análisis bioinformáticos (Figura 10). Al final de la amplificación selectiva genómica, se generan más copias del genoma de interés y menos copias del genoma contaminante.

Motif Identification

Use sliding window to determine the frequency of short sequence motifs (8-12 bp) in the *P. falciparum* genome
Select 10,000 most frequent sequence motifs for each motif length



Identificación de las secuencias motivos

Determine frequency of these motifs in the human genome
Calculate average binding distance for each motif in both the *P. falciparum* and human genome

Criteria for primer selection:
Average binding distance in parasite genome <50,000 bp
Average binding distance in host genome >500,000 bp

Motif Filtering

Requirements for primer design:

18°C < predicted Tm < 30°C

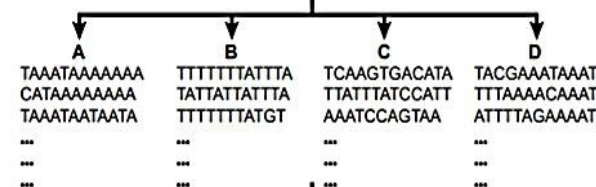
Removal of motifs with self complementarity of 4 or more contiguous bases

Removal of motifs with 4 or more predicted binding sites in the human mitochondrial genome

Filtrado de los cebadores

Primer Set Selection

Generate mutually exclusive sets by excluding motifs that share complementarity of 4 or more contiguous bases



Generación de sets de cebadores

Score motifs in each set based on the evenness of their distribution across the parasite genome
Set Score = % of 10 kb parasite genome segments with ≥ 1 binding site - % of 10 kb host genome segments with ≥ 1 binding site

Identify the primer set with the most even distribution across the parasite genome by iteratively adding high scoring motifs

Primer	Score	Primer set	Score
TAAATAAAAAA	0.61	TAAATAAAAAA, CATAAAAAAAA	0.71
CATAAAAAAAA	0.54	TAAATAAAAAA, TAAATAATAATA	0.69
TAAATAATAATA	0.43	TAAATAAAAAA, ATCATAATAAT	0.64
...
...
...
Primer set			
TAAATAAAAAA, CATAAAAAAAA, TAAATAATAATA	0.76		
TAAATAAAAAA, CATAAAAAAAA, ATCATAATAAT	0.72		
TAAATAAAAAA, CATAAAAAAAA, TAACAAAAAAA	0.61		
...	...		
...	...		
...	...		

Asignación de puntajes a los set de cebadores

Continue until set score no longer increases or all primers are included in set

Primer Set 6A	Primer Set 8A
5'-TAAATAAAAAA-3'	5'-TTTTTTTATTTA-3'
5'-CATAAAAAAAA-3'	5'-TATTATTATTTA-3'
5'-TAAATAATAATA-3'	5'-TTTTTTTATGT-3'
5'-ATCATAATAAT-3'	5'-ATTATTATGAT-3'
5'-TAACAAAAAAA-3'	5'-TTTTTTTGTGA-3'
5'-TAATAAATAAAA-3'	5'-TATTATTATTA-3'
5'-TAACATAGGTC-3'	5'-GACCTATGTTA-3'
5'-TAGTAGTAGTA-3'	5'-TACTACTACTA-3'
5'-ATAATAAATAAT-3'	5'-TATTATTATTA-3'
5'-CATAATAATAAT-3'	5'-TATTATTATGT-3'

Selección del mejor set de cebadores

Figura 10. Procedimiento para la elección del set de cebadores a utilizarse en la amplificación genómica selectiva. Fuente: Sundararaman et al. (2016).

2.5.2.3. Aplicación del SWGA: desde bacteria hasta *Plasmodium*

Son múltiples las aplicaciones que se han dado con el método SWGA en diferentes organismos. Inicialmente fue desarrollado para enriquecer el ADN de la bacteria *Wolbachia pipientis* respecto al de *Drosophila melanogaster* (Leichty et al. 2014). En este último trabajo se probaron ciertas modificaciones en el método, por ejemplo, el uso de enzimas de restricción diseñadas para que corten de manera más frecuente al ADN contaminante respecto del ADN de interés. Se observó que si había digestión de las muestras de ADN previo a aplicar el SWGA, el incremento del ADN de la bacteria mejoraba en más de dos veces comparado a aquella sin digestión previa (Figura 11). Es así que Leichty et al. (2014) implementaron un método molecular en el cual solo era necesario tener inicialmente el ADN total para enriquecer el genoma que se deseara, tomando esta ventaja, se empezó a aplicar en otras enfermedades, como en malaria.

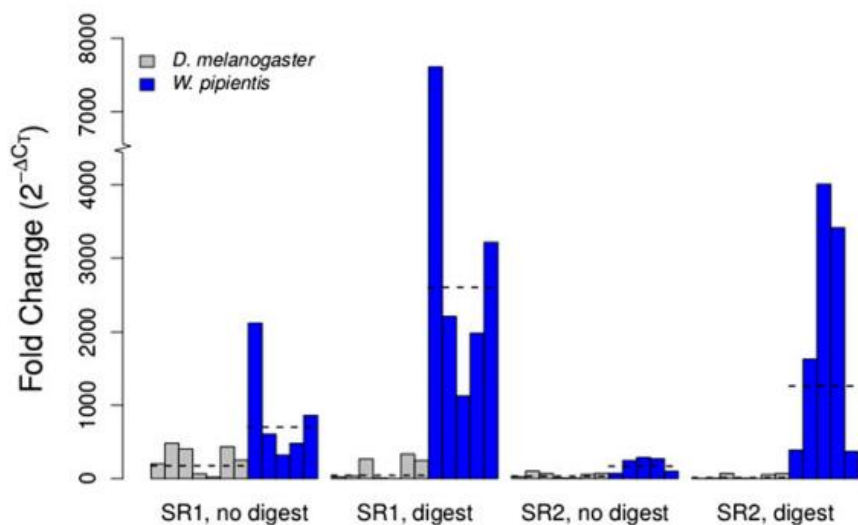


Figura 11. Efecto del uso de la enzima de restricción en el desempeño de la amplificación genómica en ADN de *Drosophila melanogaster* y *Wolbachia pipientis*. No digest = sin enzima de restricción, digest = con enzima de restricción. Fuentes: Leichty et al. (2014).

Sundararaman et al. (2016) utilizaron el SWGA con el fin de posteriormente secuenciar los genomas de *Plasmodium reichenowi* y *P. gaboni*, encontrando que ambas especies son 10 veces más diversas que *P. falciparum* y haciendo suponer que el parásito que infectó al humano posee un origen reciente con las dos primera especies. Cuando

analizaron el efecto del SWGA en *Plasmodium falciparum* vieron un incremento del ADN parasitario de 19 a 70 000 veces, correspondiente a parasitemias de 5 a 0.0001% respectivamente. Oyola et al. (2016) implementaron el SWGA en ADN *P. falciparum* proveniente de sangre en papel filtro. Se observó un incremento del ADN parasitario de más de 18 veces, determinando que una parasitemia de 0.03% (40 parásitos por 200 células blancas) era la mínima para que se genere una cobertura de más de 5X para el 50% del genoma luego de darse la amplificación genómica y el posterior secuenciamiento del genoma completo (Figura 12).

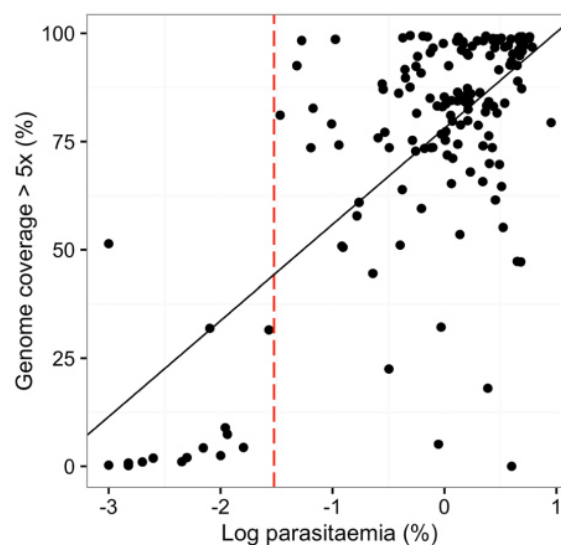


Figura 12. La parasitemia umbral fue de 0.03% (en muestras de sangre en papel filtro) para generar una cobertura de >5x al menos un 50% del genoma de *P. falciparum* luego de darse el secuenciamiento del genoma completo. Logaritmo de la parasitemia en el eje X y el porcentaje del genoma con una cobertura de >5x en el eje Y. Fuente: Oyola et al. (2016).

Si bien hay información de la utilidad del SWGA en *P. falciparum*, no se puede extrapolar para *P. vivax* debido a las diferencias en el porcentaje de Guanina y Citocina entre ambas especies (Carlton et al. 2008). Cowell et al. (2017) implementaron el método SWGA en ADN de *P. vivax*, diseñando los set de cebadores pvset1 y pvset1920, y con el objetivo de hacer útiles las muestras para el secuenciamiento del genoma completo. Luego de secuenciar el genoma completo, se alcanzó una cobertura promedio 24x con más del 95% del genoma de *P. vivax* cubiertas con al menos 5 reads. Cabe resaltar que

en una muestra sin tratamiento, el porcentaje de *reads* y porcentaje del genoma cubierto eran casi cercanos a 0 (Figura 13).

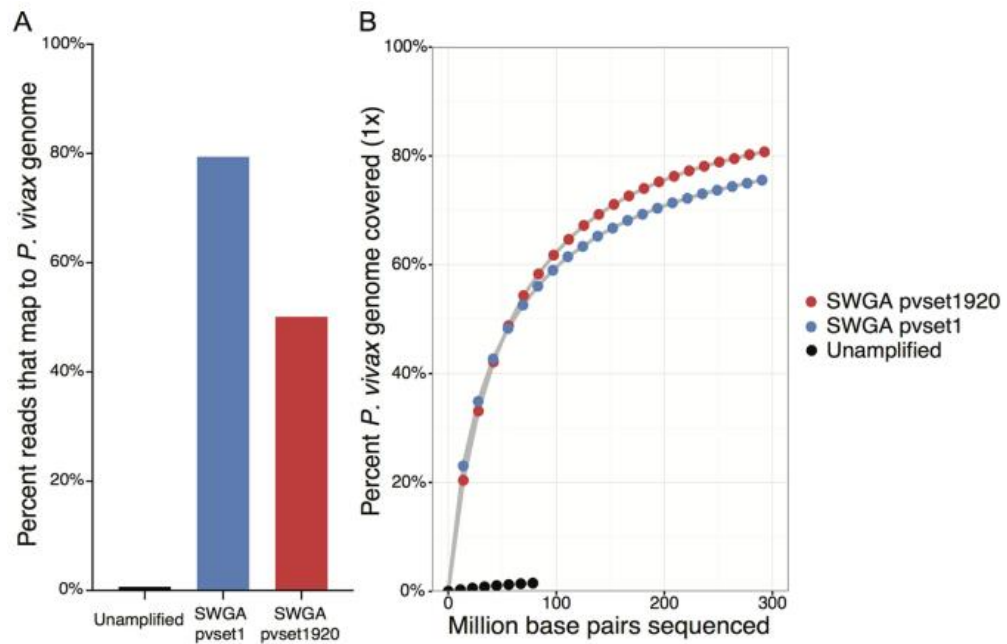


Figura 13. Prueba de los set de cebadores pvset1920 y pvset1 en el desempeño del método SWGA. A) Se incrementó el porcentaje de *reads* que mapearon el genoma de *P. vivax* (azul – pvset1, rojo – pvset1920) respecto a una muestra que no se sometió a la amplificación genómica (color negro). B) El porcentaje del genoma con una cobertura de 1x se incrementó luego de la amplificación genómica (azul – pvset1, rojo – pvset1920) en comparación a lo obtenido a la muestra sin amplificación (color negro). Fuente: Cowell et al. (2017).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Optimizar y estandarizar, de manera preliminar, el método de Amplificación Selectiva del Genoma Completo (SWGA) usando ADN de 20 muestras de *Plasmodium vivax* provenientes de las áreas de Lupuna y Cahuide en la Amazonía peruana, departamento de Loreto.

3.1. Objetivos específicos

- a.** Generar un panel de muestras con amplio rango de moléculas de ADN total, variando el ADN parasitario y manteniendo constante el del humano.
- b.** Optimizar el *mix* de reacción y condiciones del ciclado del método SWGA.
- c.** Determinar el límite de detección (LOD) del método SWGA optimizado.
- d.** Evaluar la fidelidad del método SWGA optimizado en secuencias microsatélites.
- e.** Evaluar el desempeño del método SWGA optimizado en ADN de muestras de campo.

4. HIPÓTESIS

Las modificaciones en el método amplificación selectiva del genoma completo permiten la mejora en el enriquecimiento del ADN de *Plasmodium vivax* de manera selectiva, teniendo un buen rendimiento y generando copias fieles en ADN de muestras con baja parasitemia o bajo número de moléculas de ADN parasitario.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Material biológico

Para la etapa 1, 10 muestras de sangre total provenientes de las comunidades de Lupuna y Cahuide fueron usadas, y que anteriormente tuvieron diagnóstico positivo a *Plasmodium vivax* por microscopía y PCR; se les extrajo el ADN y cuantificó el número de moléculas de ADN parasitario y humano por PCR tiempo real. Luego se usó como muestra referencial aquella, de entre las 10 muestras anteriores, que tenía la mayor concentración de ADN parasitario y a partir de esta fue realizada una serie de diluciones especificadas en la sección 5.4.1 (“Dilución de muestra referencial”), así generando un panel de muestras simuladas de ADN (o *mock samples* en inglés).

Para las etapas 2 y 3 fueron utilizados ADN total del panel de muestras simuladas de ADN. Para las etapas 4 y 5, se utilizaron ADN total de otras 20 muestras de campo provenientes de las comunidades de Lupuna y Cahuide de la región de Loreto, con concentraciones de ADN parasitario variable; estos ADNs fueron donados por otro proyecto y estuvieron almacenados a -20°C (ADN guardado).

5.2. Diseño experimental

El presente estudio fue de tipo experimental, aplicado y cuantitativo, ya que se analizaron los efectos de la variación del método SWGA en el enriquecimiento de ADN parasitario a partir de ADN total. Así se establecieron las nuevas condiciones que enriquecieron el ADN parasitario a partir de ADN total de muestras de baja parasitemia. Se trabajaron con datos cuantitativos tales como número de moléculas o concentración de ADN. Este proyecto se desarrolló en 5 etapas y cada una de estas con un objetivo. Cuando se habló de moléculas de ADN parasitario se hizo referencia a genomas del parásito, por lo tanto 1 molécula equivalió a 1 genoma.

5.2.1. Etapa 1

Se utilizaron 10 muestras de sangre, se le extrajo el ADN total, y se cuantificó el número de moléculas de ADN parasitario y humano mediante PCR de tiempo real. Se seleccionó

aquella con la mayor concentración de ADN parasitario y se diluyó esta con ADN humano, de esta manera, se generó un panel de muestras con diferentes concentraciones de ADN parasitario y ADN humano constante, esto con el fin de simular el ADN que se obtendría al extraer diferentes muestras de sangre total con variables densidades parasitarias, incluyendo las de muy baja parasitemia (< 10 parásitos/ μL). Este panel de muestras simuladas de ADN (o en inglés *Mock samples*) sirvió para los experimentos de la etapa 2. Las otras primeras 9 muestras de sangre no se utilizaron para más análisis.

5.2.2. Etapa 2

El objetivo fue optimizar el método SWGA, para ello se utilizó el panel de muestras simuladas de ADN de la “etapa 1” y se evaluaron las variaciones de los componentes y ciclado de la técnica SWGA. Estos cambios involucraron: variación en el volumen de la enzima phi29, concentración final de los “set” de cebadores, tipo de “set” de cebadores, tiempo de incubación, concentración final de dNTPs, número de rondas de amplificación genómica, dilución de productos del SWGA, volumen final de reacción y tratamiento del ADN total con enzimas de restricción.

Luego de cada modificación se calcularon las siguientes métricas: número de moléculas de ADN por microlitro, número de moléculas de ADN en la reacción del SWGA, incremento del ADN después de la amplificación genómica, nanogramos de ADN por microlitro y porcentaje de ADN parasitario en nanogramos respecto del total. Cabe recalcar que cuando se menciona “moléculas de ADN” se hace referencia al número de genomas presentes, sean de *P. vivax* o humano.

Se realizaron análisis estadísticos para determinar si hubo o no diferencias en los resultados y con estos se seleccionaron las nuevas condiciones del SWGA. Se utilizaron las condiciones propuestas de Cowell et al. (2017) y el protocolo original del *kit* GenomiPhi como referencias, y se compararon con el método SWGA optimizado en esta tesis.

5.2.3. Etapa 3

Se determinó la cantidad mínima de ADN parasitario (LOD) en la que al aplicar el método SWGA generase un enriquecimiento exitoso de ADN parasitario. Se consideró que fue exitoso al cumplir lo siguiente: Un incremento, la razón entre el número de moléculas de ADN parasitario final e inicial en la reacción, mayor a 5; y una concentración final del número de moléculas de ADN parasitario en el tubo de reacción de SWGA mayor a 1200 moléculas/ μ L. Para lograr el LOD se utilizaron las muestras de más baja concentración de ADN parasitario del panel generado en la etapa 1, a cada una se le aplicó el método SWGA optimizado y se determinó qué réplicas presentaron un enriquecimiento exitoso de ADN parasitario. Con estos datos se realizó una regresión logística para calcular la concentración mínima de ADN con un 95% de confianza.

5.2.4. Etapa 4

Se evaluó la fidelidad del método SWGA optimizado, para ello se compararon los tamaños de 16 marcadores microsatélites antes y después de que se realice la amplificación genómica en ADN almacenado (-20°C) de 20 muestras de campo y un ADN fresco del panel de muestras simuladas de ADN (usado como control). Luego se determinó si hubo variación de los tamaños.

5.2.5. Etapa 5

Se aplicó el método SWGA optimizado en ADN almacenado (-20°C) de 20 muestras de campo. Estas tuvieron previamente un diagnóstico positivo de *Plasmodium vivax*, las cuales presentaron concentraciones de ADN parasitario variables y cuyos perfiles genéticos ya se conocían. Luego de la amplificación genómica, se cuantificó nuevamente el ADN parasitario y humano, y se evaluó su desempeño.

5.3. Consentimiento ético

Se utilizaron muestras de sangre total y ADN total de un estudio previo realizado por el laboratorio de malaria (LID-UPCH), estos cuentan con aprobación del comité de ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia a través del proyecto “Impacto de los

portadores asintomáticos en la epidemiología y control de malaria en la Amazonia Peruana”, código SIDISI 57395. Los adultos y niños de estos estudios cuentan con consentimiento y asentimiento, respectivamente, para la toma de muestras se siguió con los lineamientos establecidos en la declaración de Helsinki.

5.4. Procedimientos de laboratorio

5.4.1. Dilución de la muestra referencial

La muestra referencial era aquel ADN total que tenía la más alta concentración de ADN parasitario. Ésta fue diluida con ADN humano, que provenía de la extracción de ADN de sangre total humana de un paciente que no tenía Malaria. Se generaron 13 muestras simuladas de ADN (*mock samples*), las últimas muestras tuvieron concentraciones menores a 1 molécula de ADN parasitario por microlitro.

5.4.2. Extracción de ADN

A las muestras de sangre total y sangre en papel filtro se les extrajo ADN siguiendo el protocolo del E.Z.N.A Blood DNA mini kit (OMEGA, USA) con ciertas variaciones, los pasos fueron los siguientes: Utilizar 40 µL de sangre total o 0.5 mm² de sangre en papel filtro, luego agregar 250 µL de *buffer* TEN 2X (Tris HCl, EDTA, NaCl, pH=8), 180 µL de agua estéril, y 50 µL de SDS 10%. Homogenizar con vortex e incubar a 65°C por 1 hora, agregar 25 µL de proteasa, homogenizar nuevamente con vortex e incubar a 65°C por 30 minutos. Transferir el contenido a otro tubo de 2 mL, y agregar 250 µL de *buffer* BL y 250 µL de etanol puro; luego homogenizar con vortex y transferir el contenido a una columna de sílica, primero 600 µL y luego el resto.

Centrifugar por 1 minuto a 12000 rpm después de cada traspaso, posteriormente agregar 500 µL de *buffer* HBC y centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm. Agregar 700 µL de *buffer* de lavado y centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm, esto repetir 2 veces; centrifugar nuevamente por 2 minutos a 12000 rpm luego del segundo centrifugado. Agregar 50 µL de *buffer* de elución, pre calentado a 65°C, en el centro del filtro y después

incubar por 5 minutos. Finalmente centrifugar a 12000 rpm por 1 minuto y descartar el filtro, quedando solo el tubo de 1.5 mL que contenía lo extraído.

5.4.3. Cuantificación del número de moléculas de ADN del parásito

Para la cuantificación del número de moléculas de ADN parasitario se detectó la presencia del 18S rRNA de *Plasmodium*, para lo cual fue realizado una PCR de tiempo real, basada en el protocolo de Mangold *et. al* (2005). El mix de reacción tuvo un volumen final de 25 µL que contenía 1X de *buffer* de reacción PerfeCTa® SYBR® Green FastMix (MgCl₂, dNTPs, AccuStart II Taq DNA polimerasa, SYBR Green I dye, estabilizadores), 300 nM del cebador izquierdo (Plf1: 5' - TAACGAACGAGATCTTAA - 3'), 300 nM del cebador derecho (Plf1: 5' - GTTCCTCTAAGAAGCTTT - 3') y 5 µL de ADN muestra.

Las condiciones del ciclado del PCR tiempo real consistió de una desnaturalización inicial de 95°C por 2 minutos, luego 45 ciclos que incluía 95°C por 20 segundos, 52°C por 20 segundos, y 68°C por 30 segundos; después, una extensión final a 68°C por 3 minutos. Para la curva de la temperatura fusión, se incrementó desde 65°C hasta 85°C, con incremento de 0.5°C y adquisición de imagen cada 5 segundos. Los valores del C_q y temperatura de fusión (T_m) fueron otorgados por el software Bio-Rad CFX96™ Manager.

5.4.4. Cuantificación del número de moléculas de ADN humano

Para la estimación del número de moléculas de ADN humano se cuantificó la presencia de la secuencia del Retrovirus endógeno humano 3 (ERV-3) (Yuan et al. 2001), para lo cual se realizó el PCR tiempo real. El *mix* de reacción tuvo un volumen de final de 25 µL, que contenía 1X de *buffer* de reacción PerfeCTa® SYBR® Green FastMix (MgCl₂, dNTPs, AccuStart II Taq DNA polimerasa, SYBR Green I dye, estabilizadores), 200 nM de cebador izquierdo (Erv 3: 5' – 3'), 200 nM de cebador derecho (Erv 3: 5' – 3'), y 5 µL de ADN muestra. Las condiciones del ciclado del PCR tiempo real consistió en una desnaturalización inicial de 95°C por 3 minutos, luego 39 ciclos que incluía 95°C por 20

segundos, 61.5°C por 30 segundos, y 72°C por 20 segundos; después, una extensión final a 68°C por 3 minutos. Para la curva de la temperatura de fusión se incrementó desde 65°C hasta 85°C, con incremento de 0.5°C y adquisición de imagen cada 5 segundos. Los valores del *Cq* y temperatura de fusión fueron otorgados por el software Bio-Rad CFX96™ Manager.

5.4.5. Amplificación selectiva del genoma completo (SWGA) y dilución de productos del SWGA

El método SWGA se basó en dos kits de amplificación genómica: *Kit* illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification (GE Healthcare, MA, USA) y phi29 DNA polymerase (New England Biolabs, Massachusetts, USA). Se utilizó 50 µL de volumen final de reacción con el *kit* GenomiPhi, el cual contenía 22.5 µL de *buffer* de reacción, 3 µL de *mix* de enzima, concentración final 4.4 µM de cebadores, 1.25 mM de dNTPs, 10 µL de ADN y el resto de volumen con agua grado molecular. El orden de mezcla fue el siguiente: Mezclar los dNTPs, cebadores, y agua grado molecular para las reacciones necesarias. Luego, repartir en tubos PCR de 0.2 mL. En cada uno de estos tubos agregar los 10 µL de ADN, homogenizar y colocar en el termociclador a 95°C por 3 minutos; luego, los tubos colocar a 4°C. Mezclar, en un tubo diferente y en frío, el *buffer* de reacción y el *mix* de enzima, distribuir la mezcla en los tubos PCR de 0.2 mL que ya contenían los otros componentes de la reacción. Después, homogenizar con vortex y colocar en el termociclador. Para un volumen final de reacción de 20 µL, utilizar 7.47 µL de ADN en vez de 10 µL, y 9 µL de *buffer* reacción en vez de 22.5 µL.

Se utilizó 20 µL de volumen final de reacción con las condiciones originales del *kit* GenomiPhi, el cual contenía 9 µL de *buffer* de muestra, 1 µL de ADN, 9 µL de *buffer* de reacción y 1 µL del *mix* de enzima. El orden de mezcla fue el siguiente: mezclar 9 µL del *buffer* de muestra con 1 µL de ADN en un tubo de 0.2 mL e incubar a 95°C por 3 minutos; en otro tubo mezclar 9 µL de *buffer* de reacción y 1 µL de *mix* de enzima, agregar esta mezcla a la anterior que contenía el ADN para luego incubarlo a 30°C por 1.5 horas.

Se utilizó un volumen final de reacción de 50 μ L con el *kit* phi29 DNA polymerase (New England BioLabs), que contenía una concentración final de 4.4 μ M del *set* de cebadores, 1.25 mM de dNTPs, 1% de albúmina de suero bovino (BSA), 1X de *buffer* phi29, 30 unidades de enzima phi29, 10 μ L de ADN muestra y se completó a 50 μ L con agua grado molecular. El orden de mezcla fue el siguiente: mezclar los dNTPs y cebadores para la cantidad de reacciones necesarias, luego repartir en tubos PCR de 0.2 mL. En cada uno de estos tubos agregar los 10 μ L de ADN. Mezclar en frío y en un tubo diferente el agua grado molecular, BSA, *buffer* phi29, y la enzima; esta mezcla se distribuyó en los tubos PCR de 0.2 mL que ya contenían los otros componentes de la reacción. Después, homogenizar con vortex y colocar en el termociclador.

A las condiciones anteriormente indicadas (*kit* GenomiPhi y phi29 New England BioLabs), se modificaron los siguientes componentes y condiciones del ciclado: volumen de enzima (3, 1.5 y 1 μ L), tiempo de incubación (5, 8, 12 y 16 horas), concentración final de cebadores (3.4, 4.4 y 6.4 μ M), tipo de *set* de cebadores (pvset1 y pvset1920), concentración final de dNTPs (1.25 y 4 mM), tipo de kit de amplificación genómica (GenomiPhi y phi29 New England BioLabs), volumen final de reacción SWGA (50 y 20 μ L), número de rondas SWGA (una y dos rondas), dilución de productos SWGA (1 en 50 y 1 en 10), tratamiento enzimático (sí y no) y tipo de amplificación genómica (SWGA y WGA). El ciclado del método SWGA empezó con un decrecimiento de temperatura desde 35°C hasta 30°C (una disminución de 1°C y 10 minutos por cada grado), luego a 30°C por 16 horas y se terminó con 65°C por 10 minutos. Al finalizar la reacción del método SWGA, se diluyeron los productos SWGA con *buffer* de elución, mezclando 10 μ L del producto SWGA con 490 μ L de *buffer* de elución, teniendo así una dilución 1 en 50.

5.4.6. PCR en secuencias microsatélites

Se utilizaron 3 distintos paneles de marcadores microsatélites: 5 marcadores reportados por Karunaweera et al. (2007), 4 marcadores reportados por Imwong et al. (2006) y 7

marcadores reportados en la tesis de Julio Miranda (2017). Algunos marcadores se encuentran en ligamiento físico, fueron identificados y diseñados en base al genoma de la cepa referencial Sal1. En total se utilizaron 16 marcadores, los cuales se encuentran descritos en anexos (Tabla 7).

La amplificación de microsatélites se realizó por PCR convencional. El cebador izquierdo estuvo marcado con un fluoróforo (6FAM, NED, VIC y PET), para que luego el producto de PCR fuese analizado por electroforesis capilar. La reacción de PCR tuvo un volumen final de 25 μ L el cual contuvo 2.5 μ L de 10x PCR Buffer II (Thermo Fisher Scientific™), 1.5 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de dNTPs, 200 o 400 nM de cada cebador (ver la tabla 1 en anexos), 1U de ADN polimerasa AccuStart II (Quanta Bio), completando el volumen con agua grado molecular. La amplificación se realizó en un termociclador Bio-Rad T100™.

5.4.7. Electroforesis en gel de agarosa

Se evaluaron los productos de PCR correspondientes a cada marcador en geles de agarosa al 2%. Así se comprobó si la amplificación fue exitosa y libre de amplicones inespecíficos, antes de pasar a la evaluación del tamaño de los productos por electroforesis capilar. Se cargó 5 μ L del producto SWGA y corrió en un gel de agarosa al 1%. La tinción fue realizada con bromuro de etidio y la foto del gel se tomó con un fotodocumentador.

5.4.8. Electroforesis capilar y depuración de datos

Los productos de PCR fueron separados por electroforesis de capilar en el sistema ABI PRISM 3100, previa validación del equipo utilizando muestras estándar. El sistema de electroforesis capilar que se empleó fue el GeneScan™ 500 LIZ, el cual está diseñado para medir el tamaño de fragmentos de ADN dentro del rango 35 – 500 nucleótidos y provee 16 fragmentos de hebra simple marcados: 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450, 490 y 500 nucleótidos.

Se utilizó el programa Peak Scanner v1.0 para realizar la depuración de los electroferogramas, considerando como un pico verdadero a todo aquel que presente una fluorescencia relativa mayor a 50 RFUs. Todo pico secundario que fue mayor a un tercio del tamaño del pico principal y mayor a los 50 RFUs también se consideró como un alelo; sin embargo, aquellas muestras que presentaron más de un pico o alelo en un loci determinado fueron consideradas como muestras policlonales, es decir, que existió la presencia de más de una clona de parásitos en la muestra.

5.4.9. Determinación del límite de detección (LOD)

Se realizaron 6 reacciones SWGA para cada una de las últimas 5 muestras del panel elaborado en la etapa 1 (códigos: 9, 10, 11, 12, y 13), en cada una se calculó la concentración de moléculas de ADN parasitario y humano luego de la amplificación genómica. Todas aquellas réplicas que presentaron una concentración mayor o igual a 1200 moléculas/ μ L se les etiquetó como “positiva” y a los otros como “negativa”. Luego se calculó la concentración mínima con un intervalo de confianza del 95% mediante una regresión logística que utilizó los datos de las réplicas “positiva” y “negativa” para cada una de las muestras.

5.4.10. Aplicación en muestras de campo

El método SWGA optimizado en esta tesis se aplicó en ADN de 20 muestras de campo, las cuales provenían de pacientes con diagnóstico positivo a *Plasmodium vivax* y cuyas concentraciones parasitarias fueron variables. Fue cuantificado el ADN parasitario y humano antes y después de aplicarse el método SWGA optimizado, y se calcularon las métricas siguiendo lo propuesto en la sección 5.5.1 (“cálculo de métricas” del “Procedimiento de análisis”).

5.5. Procedimiento de análisis

5.5.1. Cálculo de métricas

En la cuantificación de ADN parasitario y humano utilizando el termociclador Bio-Rad CFX96™ Manager, se obtuvieron valores del ciclo de cuantificación (o *Cq* por sus siglas

en inglés). Posteriormente estos valores de Cq fueron transformados a moléculas de ADN parasitario y humano, estos a su vez fueron cambiados a nanogramos. Con todos estos datos anteriores se calcularon las siguientes métricas: concentración de ADN en moléculas/ μ L, concentración de ADN nanogramos/ μ L, número de moléculas de ADN iniciales y finales en la reacción SWGA, incremento de ADN, porcentaje final de ADN parasitario en nanogramos respecto del total.

5.5.1.1. Número de moléculas de ADN parasitario y humano (moléculas/ μ L)

La conversión de Cq a moléculas de ADN parasitario se realizó en base a una fórmula generada a partir de la ecuación de la recta, la cual se obtuvo al desarrollar una curva estándar. Se estimó la concentración de ADN (moléculas/ μ L) conociendo solo el valor de Cq . La ecuación fue la siguiente:

$$Cq = b + a * \log[\text{concentración}]$$

Donde:

“ a ” representó el incremento del Cq respecto a una unidad del logaritmo de la concentración de ADN.

“ b ” fue el Cq que se obtuvo cuando la concentración de ADN fue mínima. “ $\log[\text{concentración}]$ ” representó el logaritmo de la concentración de ADN parasitario.

La conversión de Cq a moléculas de ADN humano se extrapoló utilizando datos de la cuantificación de ADN parasitario. Para esto fueron necesarios los valores de la concentración de ADN parasitario y la eficiencia del PCR tiempo real de la cuantificación de ADN parasitario y humano. La fórmula fue la siguiente:

$$[Y] = \frac{[x] * b_x^{cq_x}}{b_y^{cq_y}}$$

Donde:

“ $[x]$ ” fue la concentración de ADN parasitario, cuyo valor de Cq fue “ cq_x ”, con una eficiencia del PCR tiempo real de “ b_x ”.

“ b_y ” fue la eficiencia del tiempo real en la cuantificación de ADN humano, cuyo Cq fue “ cq_y ” y que representó una concentración de “ $[y]$ ”.

➤ **Antes de la reacción SWGA**

Se calculó el número de moléculas de ADN parasitario (mol_{pv_i}) y humano (mol_{erv_i}) por microlitro en el panel de muestras, antes que se diera la reacción SWGA. Para el primero se utilizó la siguiente fórmula:

$$mol_{pv_i} = \frac{10^{\frac{cq_{pv_i} - 38.6233}{-3.5971}}}{5 \cdot 5}$$

Donde:

“ cq_{pv_i} ” fue el Cq de la muestra antes de aplicar el método SWGA.

“38.6233” fue el Cq que se obtuvo cuando teóricamente solo existe una molécula de ADN en la reacción.

“-3.5971” fue la razón del incremento del ciclo de amplificación por el incremento en una unidad de logaritmo de la concentración de ADN parasitaria.

La división se dio dos veces por 5 por dos razones: por a. se utilizó 5 μ L de muestra para la cuantificación de ADN por PCR tiempo real, y b. un genoma haploide de *Plasmodium vivax* se tiene 5 secuencias del 18S ribosomal.

El cálculo del número de moléculas de ADN humano por microlitro se realizó con la siguiente fórmula:

$$mol_{erv_i} = \frac{20400 \cdot 1.8967164^{23.177}}{1.941^{cq_{erv_i}} \cdot 5}$$

Donde:

“20400” fue el número de moléculas de ADN parasitario por microlitro, cuyo valor de Cq fue “23.177” con una eficiencia de PCR tiempo real de “1.8967164”.

El valor de “1.941” correspondió a la eficiencia promedio del PCR tiempo real para el ADN humano, cuyo “ cq_{erv_i} ” fue el Cq de la cuantificación inicial de ADN humano.

La división se realizó por 5 debido a que se utilizó 5 μ L de muestra para el PCR tiempo real.

➤ **Después de la reacción SWGA**

Se estimó el número de moléculas de ADN parasitario (mol_{pv_f}) y humano (mol_{erv_f}) por microlitro luego que se dio la reacción SWGA. Estos productos SWGA fueron diluidos 1 en 50 y a partir de esta dilución se realizó la cuantificación por PCR tiempo real. Se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$mol_{pv_f} = \frac{10^{\frac{cq_{pv_f} - 38.6233}{-3.5971}}}{5 \times 5} * 50$$

$$mol_{erv_f} = \frac{\frac{20400 * 1.8967164^{23.177}}{1.941^{cq_{erv_f}}}}{5} * 50$$

Donde:

“ cq_{pv_f} ” y “ cq_{erv_f} ” fueron los valores de Cq que se obtuvieron al realizar el PCR tiempo real en la dilución 1 en 50 del producto SWGA.

El valor 50 correspondió al factor de dilución y para el caso en que la dilución fuese 1 en 10, se cambió el valor de 50 por el de 10.

5.5.1.2. Número de moléculas totales de ADN en la reacción SWGA

➤ **Antes de la reacción SWGA**

Se calculó el número de moléculas de ADN parasitario (rx_{pv_i}) y humano (rx_{erv_i}) presentes en la reacción inicial del SWGA. Se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$rx_{pv_i} = mol_{pv_i} * 10$$

$$rx_{erv_i} = mol_{erv_i} * 10$$

Donde:

“ mol_{pv_i} ” y “ mol_{erv_i} ” fueron las concentraciones iniciales de ADN parasitario y humano (moléculas/ μ L), respectivamente.

El valor de 10 fue porque se cargó 10 μ L de muestra en la reacción SWGA. Para el caso en que se cargó 7.47 μ L se reemplazó por el valor 7.47

➤ Después de la reacción SWGA

Para el cálculo del número de moléculas totales de ADN parasitario (rx_{pv_f}) y humano (rx_{erv_f}) luego de la reacción SWGA, se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$rx_{pv_f} = mol_{pv_f} * 50$$

$$rx_{erv_f} = mol_{erv_f} * 50$$

Donde:

“ mol_{pv_f} ” correspondió a la concentración final de ADN parasitario (moléculas/ μ L) y “ mol_{erv_f} ” al del humano.

En ambos casos se multiplicaron por 50 debido a que el volumen final de la reacción SWGA fue 50, para el caso de volumen final de 20 se cambió el valor de 50 por el 20.

5.5.1.3. Cálculo del incremento del ADN

Se calculó qué tantas veces se había incrementado el ADN parasitario y humano luego que se realizó la reacción SWGA. Para esto se siguió la siguiente fórmula:

$$fold_{pv} = \frac{rx_{pv_f}}{rx_{pv_i}}$$

$$fold_{erv} = \frac{rx_{erv_f}}{rx_{erv_i}}$$

Donde:

“ $fold_{pv}$ ” y “ $fold_{erv}$ ” fueron los incrementos del ADN parasitario y humano respectivamente.

“ rx_{pv_f} ” y “ rx_{erv_f} ” fueron el número de moléculas totales de ADN parasitario y humano en la reacción final del SWGA respectivamente.

“ rx_{pv_i} ” y “ rx_{erv_i} ” fueron el número de moléculas totales de ADN parasitario y humano en la reacción inicial del SWGA respectivamente.

5.5.1.4. Conversión del número de moléculas de ADN a nanogramos

Se convirtió el número de moléculas de ADN por microlitro a nanogramos por microlitro.

El cálculo se dio con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{ng}_{\text{pv}}}{\mu\text{L}} = \text{mol}_{\text{pv}} * 0.00002520698$$
$$\frac{\text{ng}_{\text{erv}}}{\mu\text{L}} = \text{mol}_{\text{erv}} * 0.00361665377$$

Donde:

“ $\text{ng}_{\text{pv}}/\mu\text{L}$ ” y “ $\text{ng}_{\text{erv}}/\mu\text{L}$ ” correspondieron a los nanogramos de ADN del parásito y humano por microlitro, respectivamente.

El valor de “0.00002520698” y “0.00361665377” correspondieron a la cantidad de ADN en nanogramos de 1 molécula de ADN parasitario y humano respectivamente.

5.5.1.5. Cálculo del porcentaje de ADN parasitario respecto del total

Se estimó el porcentaje de ADN parasitario, que es la división entre ADN parasitario y ADN total en nanogramos. Se dio de la siguiente manera:

$$\text{prop} = \frac{\frac{\text{ng}_{\text{pv}_f}}{\mu\text{L}}}{\frac{\text{ng}_{\text{erv}_f} + \text{ng}_{\text{pv}_f}}{\mu\text{L}}}$$

Donde:

“ $\text{ng}_{\text{pv}_f}/\mu\text{L}$ ” y “ $\text{ng}_{\text{erv}_f}/\mu\text{L}$ ” correspondieron al ADN parasitario y humano en nanogramos por microlitro, respectivamente.

5.5.2. Evaluación de la fidelidad del método SWGA

Se compararon los tamaños de los 16 marcadores microsatélites de las muestras, antes y después de someterse a la amplificación genómica. Se elaboró un gráfico que mostró la diferencia de los tamaños en pares de bases, además de aquellas muestras en donde no había información de dicho marcador (pérdida de datos). Se consideró que no hubo variación en el tamaño de un marcador cuando su diferencia era 0.

5.5.3. Selección de las mejores condiciones para el método SWGA

Se aplicó la prueba estadística del signo rango de Wilcoxon para las siguientes métricas: concentración final de ADN parasitario (moléculas/ μ L), incremento de ADN parasitario, y porcentaje final de ADN parasitario. Al utilizarse 3 métricas, se consideró como orden de prioridad lo siguiente: porcentaje final, concentración final de ADN parasitario y por último el incremento de ADN parasitario.

Utilizando las consideraciones anteriores, se seleccionó la modificación que indujo a un mejor desempeño en la amplificación genómica, en base a esto, se procedió a la siguiente modificación de otro componente o condición del ciclado. Finalmente, las condiciones optimizadas también se compararon con los propuestos por Cowell et al. (2017) y el protocolo original del *kit* GenomiPhi. Se consideró que la amplificación genómica fue exitosa cuando la concentración final de ADN parasitario fue mayor o igual a 1200 moléculas/ μ L.

5.5.4. Plataforma de análisis

Todos los cálculos para las pruebas estadísticas, generación de gráficos, cálculos de métricas y otros análisis de esta tesis, se realizaron mediante el lenguaje de programación R.

6. RESULTADOS

6.1. Generación del panel de muestras

De las 10 muestras de sangre analizadas, la muestra “PV14_SJ_LPT” presentó la concentración más alta, siendo su concentración inicial de ADN de *P. vivax* igual a 13 355 moléculas/ μ L. A partir de aquella más concentrada se generó el panel de muestras simuladas de ADN (*mock samples* en inglés), el cual incluyó 13 muestras de ADN total y cuyas concentraciones de ADN parasitario oscilaron desde 3013 hasta 0.21 moléculas/ μ L. Mientras que en el ADN humano se tuvieron concentraciones desde 772 hasta 323 moléculas/ μ L. Finalmente el porcentaje de ADN parasitario en nanogramos estuvo entre 2.6 y 0.000 17% (Tabla 2). Las concentraciones de este panel simularon las cantidades de ADN parasitario que se obtendrían al extraer muestras de sangre con densidad parasitarias de *P. vivax* menores a 10 parásitos/ μ L.

Tabla 2. Cuantificación de ADN parasitario y humano del panel de muestras simuladas de ADN. Rep = réplica, Cq_pv = Cq en ADN de *P. vivax*, Cq_h = Cq en ADN humano, Mol_pv = moléculas de ADN parasitario, Mol_h = moléculas de ADN humano, Ng_pv = nanogramos de ADN parasitario por microlitro, Ng_h = nanogramos de ADN humano por microlitro, Percen_pv = Porcentaje de ADN parasitario.

Nombre	Rep	Cq_pv	Cq_h	Mol_pv (mol/ μ L)	Mol_h (mol/ μ L)	Ng_pv (ng/ μ L)	Ng_h (ng/ μ L)	Percen_pv (%)
Muestra 1	1	21.07	24.89	3 033.25	767.3	0.076459	2.7751	2.68134
Muestra 1	2	21.09	24.88	2 994.66	772.41	0.075486	2.7935	2.63109
Muestra 2	1	23.61	25.7	596.74	448.4	0.015042	1.6217	0.91901
Muestra 2	2	23.64	25.65	585.39	463.52	0.014756	1.6764	0.87254
Muestra 3	1	24.69	25.52	298.91	505.25	0.007535	1.8273	0.41064
Muestra 3	2	24.71	25.39	295.11	550.75	0.007439	1.9919	0.37207
Muestra 4	1	25.76	25.82	150.69	414.1	0.003798	1.4976	0.25298
Muestra 4	2	25.89	25.71	138.66	445.44	0.003495	1.611	0.21648
Muestra 5	1	26.82	25.56	76.45	492.03	0.001927	1.7795	0.10818
Muestra 5	2	27.08	25.59	64.73	482.33	0.001632	1.7444	0.09345
Muestra 6	1	28.31	25.79	29.46	422.42	0.000742	1.5277	0.04858
Muestra 6	2	28.45	25.71	26.93	445.44	0.000679	1.611	0.04212
Muestra 7	1	29.05	25.63	18.34	469.71	0.000462	1.6988	0.02721
Muestra 7	2	29.33	25.49	15.33	515.41	0.000386	1.8641	0.02073
Muestra 8	1	30.63	25.94	6.67	382.42	0.000168	1.3831	0.01216
Muestra 8	2	30.86	25.86	5.76	403.26	0.000145	1.4584	0.00995
Muestra 9	1	31.81	25.61	3.13	475.98	0.000079	1.7215	0.00459
Muestra 9	2	31.88	25.65	3.00	463.52	0.000079	1.6764	0.00451
Muestra 10	1	33.24	26.19	1.25	323.99	0.000032	1.1718	0.0027
Muestra 10	2	33.24	26.19	1.25	323.99	0.000032	1.1718	0.0027
Muestra 11	1	34.02	26.06	0.76	353.16	0.000019	1.2773	0.0015
Muestra 11	2	34.22	26.06	0.67	353.16	0.000017	1.2773	0.00132
Muestra 12	1	35.41	25.52	0.31	508.62	0.000008	1.8395	0.00043
Muestra 12	2	35.45	25.51	0.3	505.25	0.000008	1.8273	0.00042
Muestra 13	1	36.58	25.3	0.15	584.62	0.000004	2.1144	0.00018
Muestra 13	2	35.54	25.3	0.29	584.62	0.000007	2.1144	0.000343

6.2. Optimización del método SWGA

Las nuevas condiciones del ciclado y componentes del método SWGA incrementaron la concentración y porcentaje final de ADN parasitario (más detalles del proceso previo, en la sección de anexos 11.2) en comparación con las propuestas por Cowell et al. (2017) y el *kit* GenomiPhi (ambas usadas como referencia). Dichas nuevas condiciones en los componentes y ciclado fueron: 24 horas de tiempo de incubación, 6.4 μ M concentración

final del set de cebadores pvset1920 y 3.4 μ M del set pvset1, 1.25 mM de concentración final de dNTPs, una ronda de amplificación genómica, volumen final de 50 μ L de la reacción, dilución 1 en 50 de los productos de la primera ronda de amplificación genómica y sin tratamiento con enzima de restricción. A partir de aquí se realizaron más modificaciones, detalladas a continuación.

Usando las condiciones anteriores, volumen final de 50 μ L y bajo el sistema del *kit* phi29 New England, se incrementaron la concentración en >19.35 veces y porcentaje final de ADN parasitario en >11.99 veces comparado con lo obtenido aplicando las condiciones de ciclado y componentes propuestos por Cowell et al. (2017), que generaron una concentración final de ADN parasitario de 344 moléculas/ μ L (Figura 14 - columna 1; tabla 3) y porcentaje final de ADN parasitario de 0.167% (Figura 15 - columna 1; tabla 4) a partir de 24 moléculas/ μ L y 0.04 % (muestra 7) respectivamente. Cambiando al sistema del *kit* GenomiPhi, se observó un segundo incremento de >5.83 veces en la concentración (Figura 14 - columnas 3 y 2; tabla 3) y de >2.39 veces en el porcentaje final de ADN parasitario (Figura 15 - columnas 3 y 2; tabla 4) en comparación a lo obtenido con el sistema del *kit* phi29 New England.

Manteniendo las condiciones anteriores (sistema del *kit* GenomiPhi), cambiando a un volumen final de 20 μ L y al realizar dos rondas consecutivas de amplificación genómica, se observó la disminución de la concentración final de ADN en ~1.58 veces (Figura 14 - columnas 6 y 5; tabla 3) y un aumento del porcentaje final de ADN parasitario en ~3.11 veces (Figura 15 - columnas 6 y 5; tabla 4) en comparación con lo obtenido con solo una ronda de amplificación. Utilizando las últimas condiciones (dos rondas consecutivas de SWGA + sistema del *kit* GenomiPhi + volumen final de 20 μ L) se observó que la concentración final fue mayor en >35.13 veces (Figura 14 - columnas 6 y 4; tabla 3) y el porcentaje final en >135.75 veces (Figura 15 - columnas 6 y 4; tabla 4) en comparación con lo obtenido aplicando las condiciones de componentes y ciclado del mismo *kit* GenomiPhi.

En base a estos resultados, el método SWGA optimizado consistió en el uso del *kit* de amplificación genómica GenomiPhi con 1 μL volumen de su enzima phi29, dos rondas consecutivas de SWGA, 24 horas de tiempo de incubación, 6.4 μM concentración final del set de cebadores pvset1920 para la primera ronda de amplificación genómica y 3.4 μM del pvset1 para la segunda ronda, 1.25 mM de concentración final de dNTPs, 20 μL de volumen final de reacción, dilución 1 en 50 de los productos SWGA provenientes la primera ronda de amplificación genómica, y sin tratamiento con enzima de restricción.

Utilizando el método SWGA optimizado en este estudio, se mostró que las muestras del panel (*mock samples*) incrementaron su concentración de ADN parasitario (>805 veces) y porcentaje de ADN parasitario (>218 veces) en comparación a su estado inicial, cuyas concentraciones iniciales eran menores a 300 moléculas/ μL y porcentajes iniciales de ADN parasitario menores a 0.5% (presencia de ADN humano es más del 99%). Incluso, algunas muestras tuvieron presencia del ADN humano en un 50%. La muestra 10, cuya concentración inicial de ADN parasitario era de ~ 1 molécula/ μL y porcentaje inicial de $\sim 0.002\%$, incrementó su concentración hasta ~ 19811 moléculas/ μL y porcentaje final de 1.727% , luego de darse la amplificación genómica.

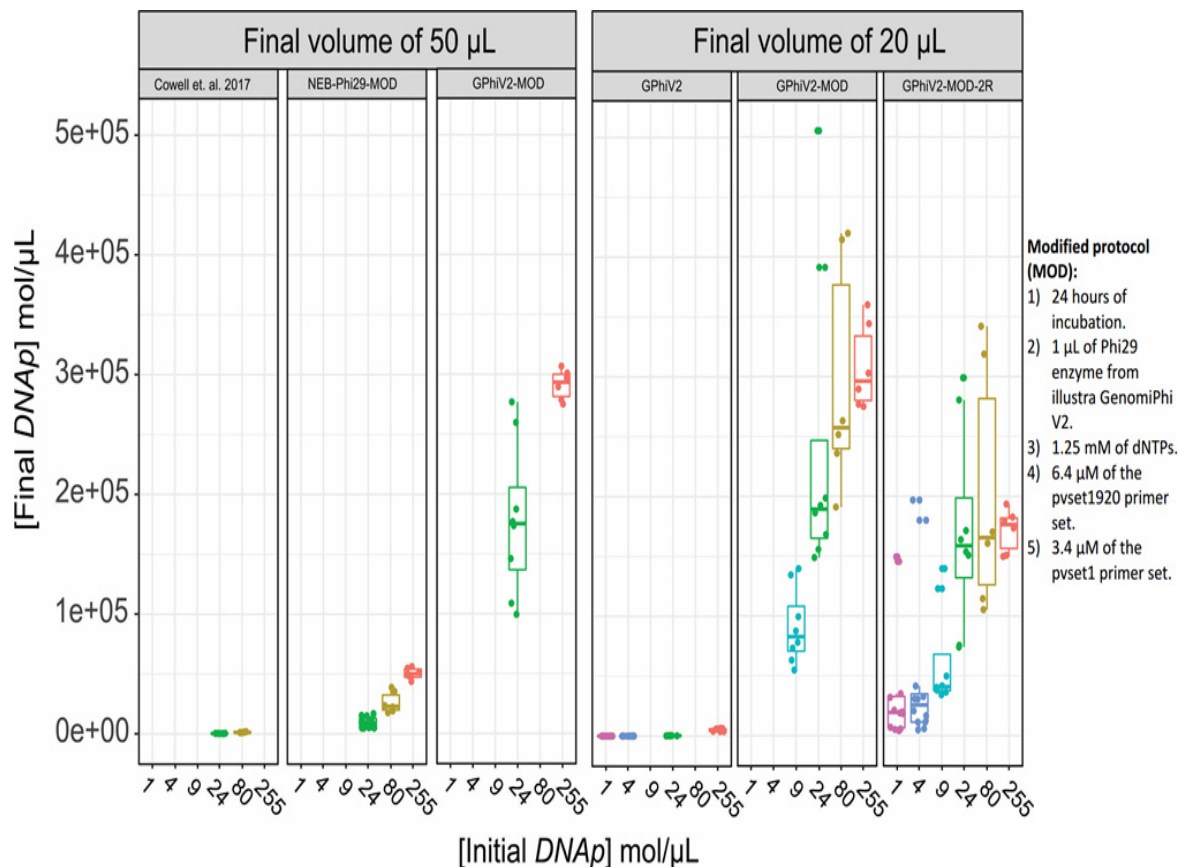


Figura 14. Cuantificación de ADN parasitario en los diferentes protocolos. Concentración final de ADN parasitario (moléculas/μL) en el eje Y; y las muestras, cada una representada por un color distinto, en el eje X. Las concentraciones iniciales de las muestras 4, 5, 7, 8, 9, y 10 fueron 255, 80, 24, 9, 4, y 1 moléculas/μL, respectivamente. NEB-Phi29 = Kit phi29 New England Biolab, GPhiV2 = Kit GenomiPhi, MOD = Protocolo modificado, 2R = dos rondas de amplificación genómica.

Tabla 3. Cuantificación de ADN parasitario en los diferentes protocolos. Se presentan las medianas de las concentraciones finales (moléculas/μL) generadas en cada muestra (4-10) y cada protocolo.

	50 μL	50 μL	50 μL	20 μL	20 μL	20 μL
Muestra	Cowell et al. 2017	NEB-Phi29-MOD	GPhiV2-MOD	GPhiV2	GPhiV2-MOD	GPhiV2-MOD-2R
4	-	50 293	293 261	5 018	296 141	176 305
5	1 186	22 957	-	-	257 240	165 420
7	344	11 878	175 165	297	189 166	158 694
8	-	-	-	-	82 698	40 966
9	-	-	-	8	-	26 061
10	-	-	-	12	-	19 811

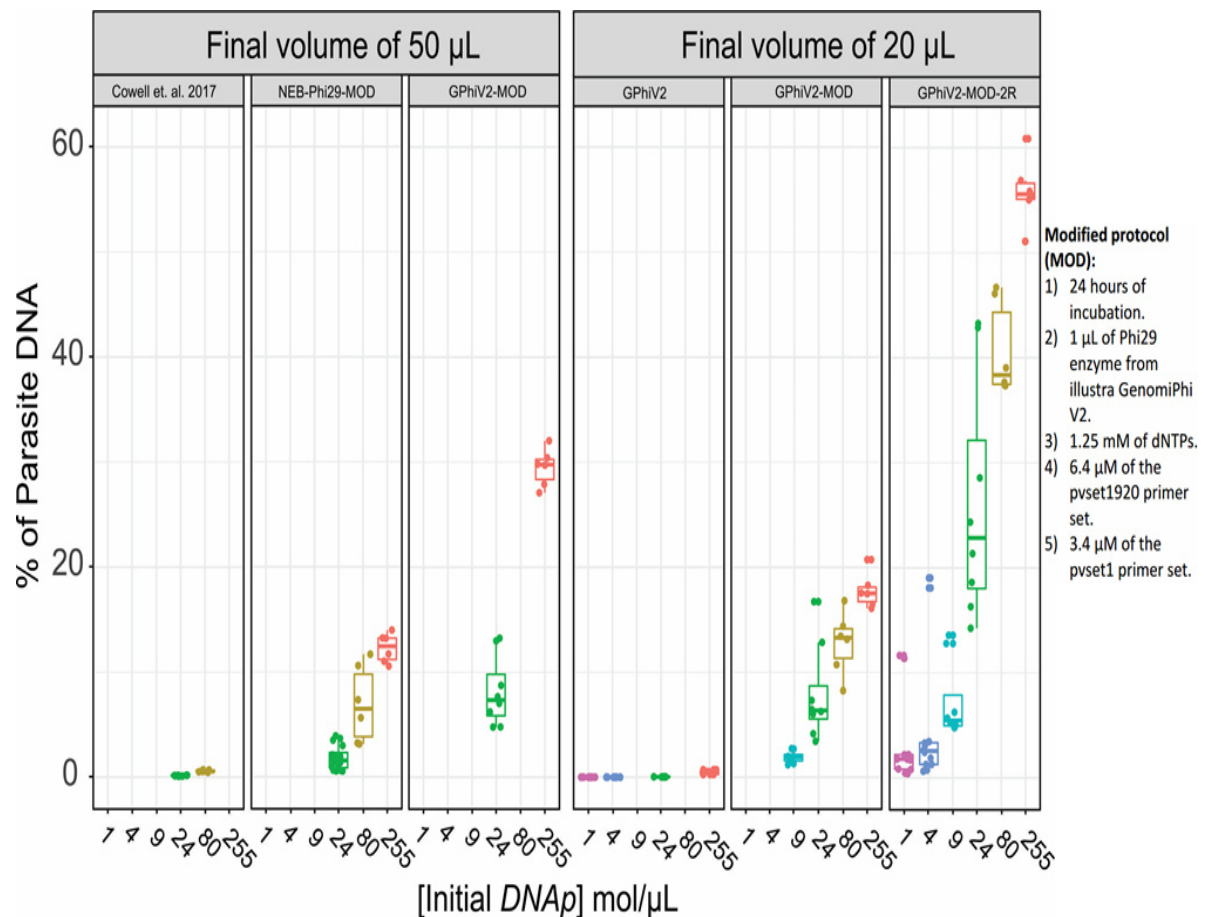


Figura 15. Porcentaje final de ADN parasitario (%) en el eje Y; y las muestras, cada una representadas por un color distinto, en el X. Los porcentajes iniciales de las muestras 4, 5, 7, 8, 9, y 10 fueron 0.4520, 0.1361, 0.0405, 0.0177, 0.0078, 0.0024 %, respectivamente. NEB-Phi29 = Kit phi29 New England Biolab, GPhiV2 = Kit GenomiPhi, MOD = Protocolo modificado, 2R = dos rondas de amplificación genómica.

Tabla 4. Porcentaje final de ADN parasitario en los diferentes protocolos. Se presentan las medianas de los porcentajes finales (%) generados en cada muestra (4-10) y cada protocolo.

	50 µL	50 µL	50 µL	20 µL	20 µL	20 µL
Muestra	Cowell et al. 2017	NEB-Phi29-MOD	GPhiV2-MOD	GPhiV2	GPhiV2-MOD	GPhiV2-MOD-2R
4	-	12.44	29.77	0.4094	17.51	55.58
5	0.5405	6.48	-	-	13.28	38.36
7	0.1671	2.53	7.35	0.0276	6.36	22.85
8	-	-	-	-	1.91	5.46
9	-	-	-	0.0009	-	2.49
10	-	-	-	0.0012	-	1.73

6.3. Límite de detección (LOD)

El método SWGA optimizado necesitó como mínimo una muestra con concentración inicial de ADN parasitario de 1.29 moléculas/ μ L (intervalo de confianza del 95%), lo que permitió una amplificación genómica exitosa de más de >1200 moléculas/ μ L (Figura 16). Dicho valor correspondió al LOD₆, que se calculó en base a 6 repeticiones para cada muestra.

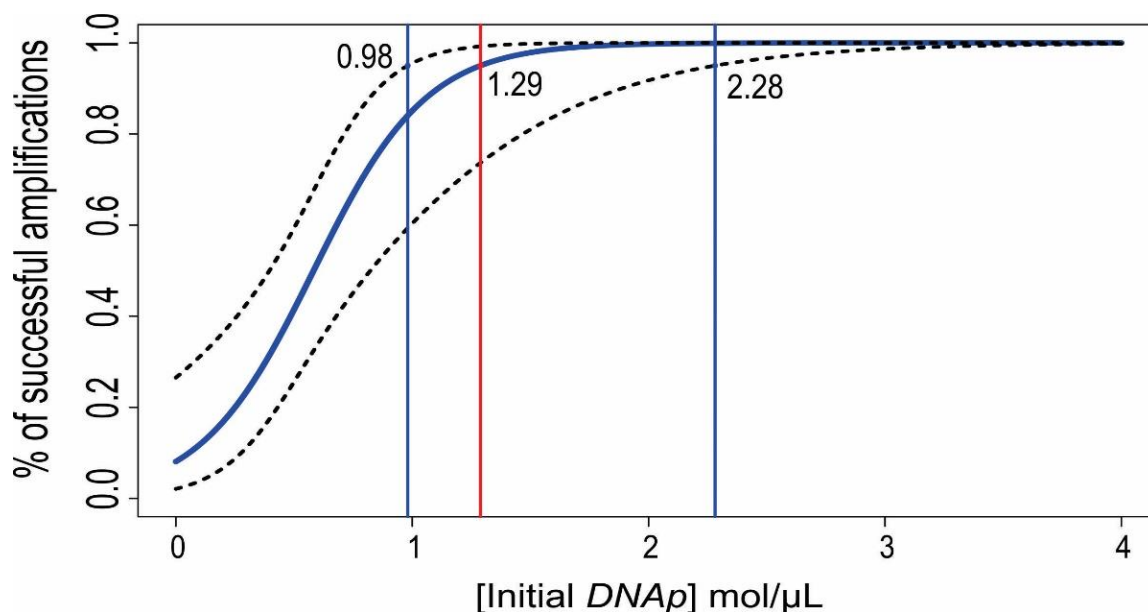


Figura 16. Límite de detección (LOD) del método SWGA optimizado. Regresión lineal a partir del número de repeticiones en cada muestra que presentaron concentraciones finales de ADN parasitario ≥ 1200 moléculas/ μ L. En el eje X, la concentración de ADN parasitario (moléculas/ μ L); en el Y, probabilidad de amplificaciones exitosas. El valor del LOD (línea roja) se encuentra entre un límite mínimo y máximo (líneas azules).

6.4. Aplicación del método SWGA optimizado en muestras de campo

6.4.1. Análisis de la fidelidad del método

Se evaluó la fidelidad del método SWGA optimizado en 16 de marcadores microsatélites en ADN almacenado (-20°C) de 20 muestras de campo más un ADN fresco del panel de muestras simuladas de ADN (*mock samples*). Tomando como foco de análisis el total de alelos, hubo una pérdida de datos de 3.57% (Figura 17, color gris), esto significó que no se encontró la presencia de dichos marcadores luego de la amplificación genómica. El 97.22 % del porcentaje restante de alelos mantuvieron el mismo tamaño antes y

después del SWGA, el resto abarcó aquellos marcadores con variaciones del tamaño en 1 o más motivos de repetición (Figura 17, color azul claro).

Tomando como foco de análisis la fidelidad a través de los cromosomas de *P. vivax*, solo los marcadores de los cromosomas 2, 8, 11 y 13 tuvieron 100% de identidad y 0% de pérdida de datos. Se obtuvieron resultados variables en el resto de cromosomas, reportándose entre 90 – 95% de identidad y 4.76–9.52% de pérdida de datos (Tabla 5).

Analizando el desempeño del método en algunas muestras, cabe precisar que la muestra AL007891 presentó una concentración final de ADN parasitario de 0 moléculas/ μ L por medio del PCR tiempo real (luego de someterse al SWGA), aunque mantuvo 100% de igualdad en los marcadores microsatélites (15 de 16) y solo uno no amplificó (1 de 16). Caso diferente sucedió en la muestra AC009044, que a pesar que tuvo la segunda mayor concentración final (~13418 moléculas/ μ L) luego de la amplificación genómica, no se detectaron la presencia de 4 de 16 marcadores.

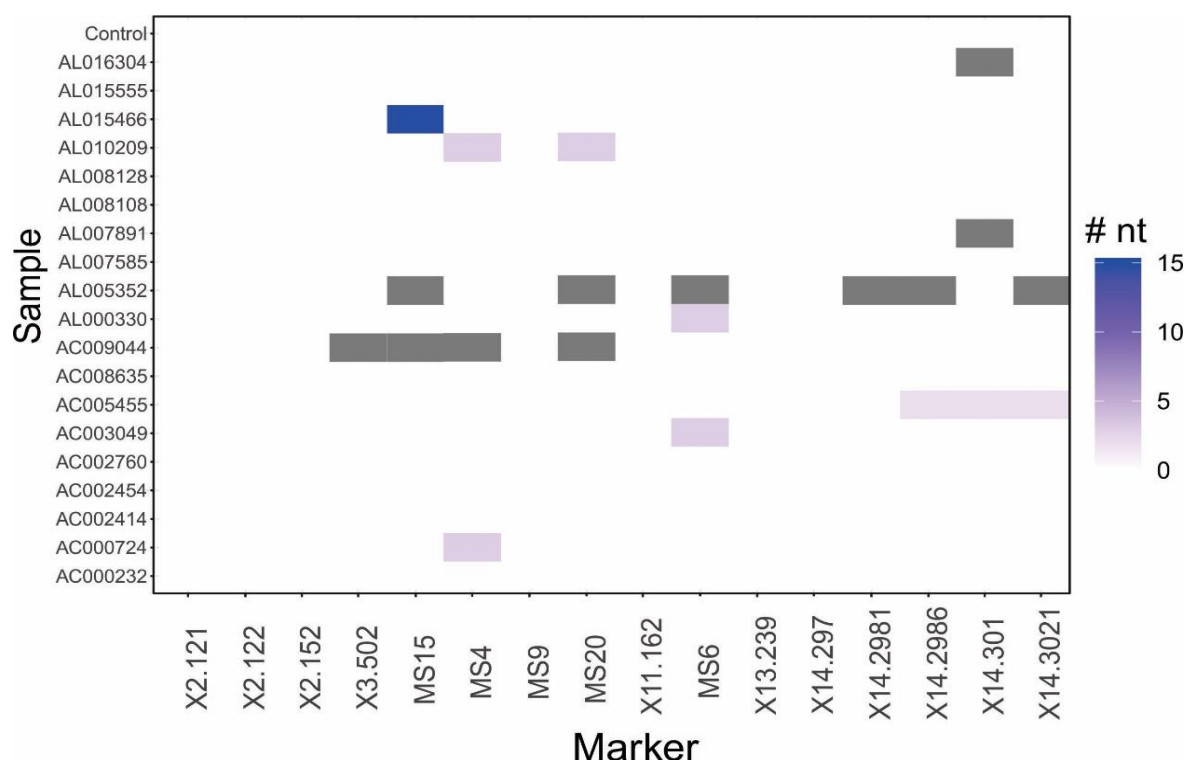


Figura 17. Fidelidad del SWGA en los 16 marcadores en ADN almacenado (-20°C) de 20 muestras de campo y un ADN fresco del panel de muestras simuladas de ADN (usado como control). Dos muestras provenientes de la AL007585 presentaron los mismos perfiles genéticos, por lo que solo se colo una de ellas. Código de la muestra en el eje “Y” y los marcadores microsatélites (ordenados desde el cromosoma 2 hasta el 14) en el “X”. El color azul representa la máxima diferencia de tamaño encontrada (más de 1 motivo de repetición); el azul claro, diferencia de 1 motivo de repetición; gris, no hubo dato; blanco, no hubo diferencia en los tamaños de los marcadores.

Tabla 5. Fidelidad del SWGA en los 16 marcadores distribuidos en los cromosomas de *P. vivax*.

Cromosoma	Marcador	Inicio	Motivo de repetición	Igualdad (%)	Información perdida (%)
2	2.121	121392	TTA	100.00	0.00
2	2.152	152435	AAT	100.00	0.00
2	2.122	122021	ATA	100.00	0.00
3	3.502	451099	AACGGATG	100.00	4.76
5	MS15	1110660	(TCT) ₁₀	94.74	9.52
6	MS4	390261	(AGT) ₁₈	90.00	4.76
8	MS9	1394242	(GGA) ₁₈	100.00	0.00
10	MS20	1345613	(GAA) ₁₁ GAG(GAA) ₁₃ (CAA) ₄ GAA(CAA) ₅	94.74	9.52
11	11.162	1859261	ATAC	100.00	0.00
11	MS6	1760698	(TCC) ₂ (TCT) ₃ (CCT) ₂ (TCC) ₂	90.00	4.76
13	13.239	1601741	TTTA	100.00	0.00
14	14.297	2965458	AAG	100.00	0.00
14	14.2986	2986814	AT	95.00	4.76
14	14.3021	3021021	TA	95.00	4.76
14	14.3010	3010226	AT	94.74	9.52
14	14.2981	2981291	AT	100.00	4.76
Total				97.22	3.57

6.4.2. Incremento de ADN parasitario

Luego de someterse el ADN almacenado (-20°C) de las 20 muestras de campo al método SWGA optimizado, se calcularon las concentraciones finales de ADN parasitario. Tomando como análisis las muestras que tuvieron una amplificación genómica exitosa, se determinó que el 80% de las muestras incrementaron sus concentraciones hasta ≥ 1200 moléculas/ μ L; tres de las 4 muestras restantes presentaron concentraciones menores y solo en una se obtuvo una concentración final de 0 moléculas/ μ L (Figura 18 y tabla 6). En la tabla 6 también se colocó el valor de una muestra control, el cual proviene de un ADN fresco del panel de muestras simuladas de ADN (*mock samples*).

En base al porcentaje final de ADN parasitario generado luego del SWGA, el 10% del total (2 de 20 muestras) presentaron un porcentaje final de ADN parasitario de 100% (0% de presencia de ADN humano; figura 19 y tabla 6). El 60% de las muestras (12 de 20) presentaron inicialmente porcentajes de ADN parasitario menores a 0.6%; sin embargo, aumentaron sus porcentajes hasta más de 1% luego de someterse a la amplificación genómica, incluso una de las muestras llegó a más del 60% de presencia de ADN del parásito (~40% de ADN humano; figura 19 y tabla 6). En cambio, el 25% del total (5 de 20) presentaron, sin excepción, porcentajes finales de ADN parasitario mayores al 20% (figura 19 y tabla 6). Solo en el 5% del total (una muestra con código AC002454) no se pudo calcular el porcentaje inicial de ADN parasitario y no pasó el 1% (~0.958%) de porcentaje final luego de realizarse la amplificación genómica (figura 19 y tabla 6).

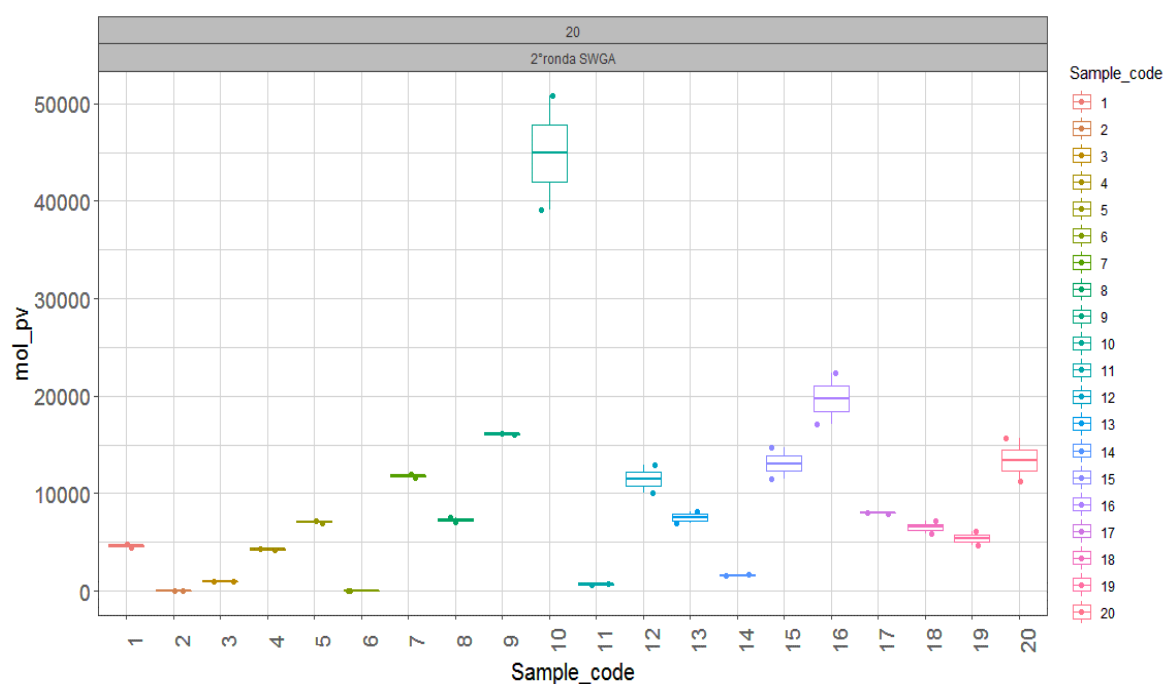


Figura 18. Cuantificación del ADN parasitario en el ADN almacenado (-20°C) de 20 muestras de campo. Concentración final de ADN parasitario (moléculas/μL) en el eje Y; y las muestras, cada una representada por un color distinto, en el eje X.

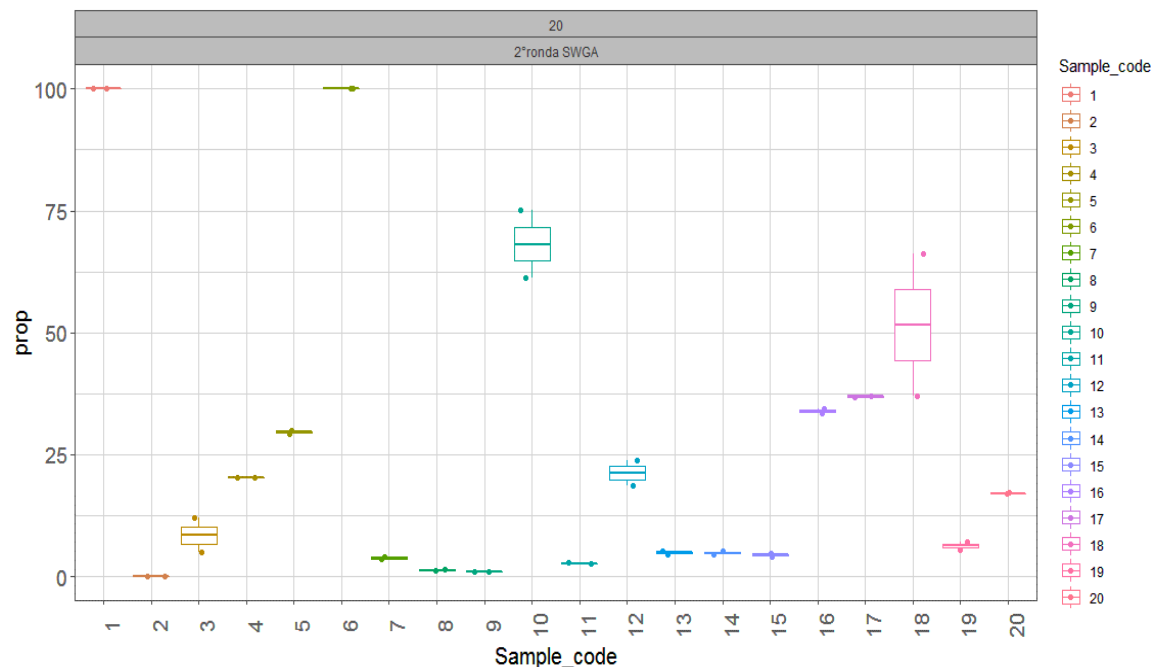


Figura 19. Cuantificación del porcentaje del ADN parasitario en ADN almacenado (-20°C) de 20 muestras de campo. Porcentaje final de ADN parasitario (%) en el eje "Y"; y las 20 muestras, cada una representada por un color distinto, en el "X".

Tabla 6. Concentraciones y porcentajes de ADN parasitario antes y después de la aplicación del método SWGA optimizado en ADN almacenado (-20°C) de 20 muestras de campo y un ADN fresco del panel de muestras simuladas de ADN (*mock sample*), usado como control (C-0008). En la muestra AC002454 no se pudo calcular el porcentaje inicial de ADN parasitario, es por ello el símbolo “?”.

Muestra	Código	Antes del SWGA (moléculas/ μ L)	Después del SWGA (moléculas/ μ L)	Antes del SWGA (%)	Después del SWGA (%)
Control	C-0008	8.97	45 706.30	0.018	5.964
AL016304	4	7.58	4 262.49	0.258	20.201
AL015555	17	44.94	7 981.39	0.409	36.875
AL015466	15	121.22	13 078.42	0.163	4.374
AL010209	18	20.71	6 537.07	3.382	51.598
AL008128	3	29.08	932.03	0.3	8.457
AL008108	14	92.64	1 607.13	0.071	4.769
AL007891	2	7.93	0.00	1.673	0.000
AL007585	1	18.58	4 605.84	1.861	100.000
AL007585	16	596.74	19 732.60	1.573	33.940
AL005352	6	4.29	16.83	0.307	100.000
AL000330	5	67.27	7 068.54	1.013	29.567
AC009044	20	964.46	13 417.71	0.516	16.980
AC008635	19	89.72	5 430.34	0.224	6.310
AC005455	11	76.45	680.22	0.373	2.663
AC003049	7	1124.62	11 794.69	0.389	3.800
AC002760	10	66.84	44 898.62	0.392	68.163
AC002454	9	151.66	16 087.32	?	0.958
AC002414	13	115.90	7 538.40	0.190	4.847
AC000724	12	1139.11	11 474.54	1.214	21.207
AC000232	8	383.67	7 325.02	0.205	1.295

7. DISCUSIÓN

La baja concentración de ADN parasitario (~1 molécula/μL) induce a que el éxito de la amplificación de marcadores para los estudios de genética de poblaciones sea de un promedio de 57% (Manrique, 2018). Esto genera un sesgo en la información y por lo tanto las conclusiones de los trabajos no incluyen en su totalidad a la población de parásitos de baja densidad. Por ello, en el presente estudio se optimizó el método SWGA para su aplicación en muestras de *Plasmodium vivax* de muy baja densidad parasitaria (< 10 parásitos/μL) o concentración de ADN (~ 1 – 10 moléculas/μL) con el fin de incrementar el ADN del parásito respecto del humano, y así permitir un menor sesgo en estudios genéticos del parásito. De esta manera se modificaron las condiciones del ciclado y componentes del método SWGA, tales como volumen de enzima, tiempo de incubación, set de cebadores, concentración final de cebadores, tipo de *kit* de amplificación genómica, volumen final de reacción, número de rondas de amplificación, y tratamiento con enzima de restricción.

7.1. Optimización del método SWGA

La modificación de las condiciones del ciclado y componentes del método SWGA ha permitido la mejora considerable de su desempeño, generando concentraciones de ADN parasitario > 1200 moléculas/μL y el aumento del porcentaje de ADN parasitario en más de 218 veces, incluso teniendo muestras con el 50% de solo ADN de *P. vivax*. Esta mejora, respecto a lo que propuso Cowell et al. (2017), si bien se debió en parte a las diferentes concentraciones de los componentes y condiciones del ciclado, tuvo un principal rol el *kit* de amplificación genómica. Esta variación del desempeño entre *kits* (GenomiPhi y phi29 New England) se basaría en la composición de los *buffers*, cuyos detalles no son proporcionados por los fabricantes. Dicha variación del desempeño de los *kits* de amplificación genómica se observó también en el trabajo de Yilmaz et al. (2010) en donde se observó que el número de unidades taxonómicas operacionales, como parte del análisis cuantitativo de metagenomas, varió cuando se utilizaban

diferentes kits de amplificación genómica. Yilmaz et al. (2010) también acotó que dicha variación en sus resultados se debería a la composición de los *buffers* de los *kits* utilizados.

El diseño de los cebadores utilizados para el SWGA ha tenido un papel importante en el desempeño del método respecto al protocolo original del *kit* GenomiPhi, aquellos cebadores han permitido el enriquecimiento selectivo del genoma de *P. vivax* debido a que han sido diseñados para unirse a secuencias motivos que se encuentren en mayor frecuencia en el genoma del parásito que del humano (Cowell et al. 2017). Caso muy contrario a los cebadores aleatorios que vienen con el *kit* GenomiPhi, quienes se unen a cualquier secuencia de ADN (illustra™ nucleic acid amplification, GE Life sciences).

Otros trabajos también modificaron las condiciones del ciclado y componentes del método de amplificación genómica con el objetivo de mejorar su desempeño. En Leichty et al. (2014) utilizaron enzimas de restricción específicas para el ADN de *Drosophila melanogaster* con el fin de disminuir los sitios de unión de los cebadores y así incrementar la amplificación del ADN de *Wolbachia pipientis*, observándose un incremento de 7500 veces en una muestra digerida y 2000 veces en una muestra no digerida. Oyola et al. (2014) incorporaron el cloruro de tetrametilamonio en los *buffers* del *kit* de amplificación genómica con el objetivo de mejorar el enriquecimiento genómico de *P. falciparum* y así mejorar la cobertura de sus secuencias ricas en AT al momento de secuenciar el genoma completo, generando datos de secuencia del genoma completo de alta calidad en el 99.8% del genoma de *P. falciparum*. En la presente tesis se utilizaron métricas diferentes a los anteriores trabajos mencionados (número de moléculas y porcentaje final de ADN parasitario) para evaluar la mejora del desempeño del método SWGA. Es muy probable que si se hubiese utilizado las métricas de los otros trabajos (Leichty et al. 2014 y Oyola et al. 2014), como la cobertura y número de *reads* que mapean el genoma de referencia, también se hubiesen incrementado sus valores.

En el presente estudio, las condiciones optimizadas del ciclado y componentes del método SWGA han permitido que algunas muestras del panel de muestras simuladas de ADN (*mock samples*) incrementen la presencia del ADN parasitario hasta al menos un 50% del ADN total, esto solo ha sido posible a partir de muestras con concentraciones iniciales de ADN parasitario de ~200 moléculas/ μ L. Muestras con concentraciones mucho menores (~1 molécula/ μ L) si bien no sobrepasaron el 5% de porcentaje final de ADN parasitario, sí tuvieron un considerable incremento del porcentaje en comparación con sus porcentajes iniciales (>218 veces). En otro estudio se ha reportado la reducción de la presencia ADN humano (o incremento del ADN parasitario) hasta menos del 30% (~70% de ADN parasitario) a partir de muestras con densidades parasitarias de 5 000 y 10 000 parásitos/ μ L y luego de utilizar el método de filtración de leucocitos (Venkatesan et al. 2012). Mientras que un paso extra a la filtración de leucocitos, que incluyó el cultivo *ex vivo* de las muestras, permitió que el porcentaje de ADN humano disminuya hasta 38.15% y en otra muestra a 4.31%, tomando en cuenta que el porcentaje inicial de ADN humano en estas muestras fue de ~ 95% (Auburn et al. 2013).

Cabe recalcar que en los estudios de Auburn et al. (2013) y Venkatesan et al. (2012) se trabajaron con muestras de sangre de alta parasitemia (>5000 parásitos/ μ L), por lo tanto, hubo un porcentaje alto de presencia inicial de ADN parasitario. En cambio, en esta tesis solo se trabajó con ADN total con un porcentaje de ADN parasitario menor a 0.5%, simulando a lo que se obtendría con una muestra de baja densidad parasitaria (< 10 parásitos/ μ L). No se han reportado otros trabajos en malaria que hayan aplicado un método de enriquecimiento genómico en muestras con bajas concentraciones de ADN parasitario (~1 genoma parasitario/ μ L), baja densidad parasitaria (<10 parásitos/ μ L) o bajo porcentaje inicial de ADN de *P. vivax* (0.5 – 0.00270 %). Lo más cercano ha sido el trabajo de Cowell et al. (2017) quienes implementaron el método SWGA en *P. vivax* utilizando, en su mayoría, muestras con altas densidades parasitarias (>2572 parásitos/ μ L).

7.2. Límite de detección

Se determinó que la concentración mínima inicial de ADN de *P. vivax*, para obtener una amplificación genómica exitosa (>1200 moléculas/ μL), fue de 1.29 moléculas de ADN parasitario/ μL . En otros trabajos no se reportan cuánto sería la concentración o cantidad mínima de ADN para que la amplificación genómica genere información de buena calidad en *P. vivax*; a excepción de un estudio con *P. falciparum*, quienes propusieron que 180 genomas del parásito serían necesarios como mínimo para que, luego del secuenciamiento del genoma completo, se obtenga una cobertura de 5X para el 50% del genoma del parásito (Oyola et al. 2016). Con el método SWGA optimizado en esta tesis, se recuperarán muestras con concentraciones de ADN parasitario de ~ 1.29 moléculas/ μL (límite inferior y superior de $0.98 - 2.28$ moléculas/ μL), que equivalen a trabajar con sangre total de 0.6 parásitos/ μL (límite inferior y superior de $0.49 - 1.30$ parásitos/ μL) o sangre en papel filtro de 12.3 parásitos/ μL (límite inferior y superior de $9.34 - 21.82$ parásitos/ μL). Normalmente al utilizar estas muestras se obtiene una pérdida de datos hasta 60% en los estudios de genética de poblaciones (Manrique, 2018).

7.3. Fidelidad del SWGA

En la presente tesis, la fidelidad del método SWGA optimizado en los marcadores ha sido en más del 95% del total de alelos. Es posible que las diferencias encontradas en el porcentaje restante se deban a ciertas causas, una de ellas es que exista la posibilidad del error en la genotipificación inicial, que suele suceder y está reportado también en el estudio de Wang et al. (2009). En este trabajo de Wang et al. (2009) algunas muestras se tuvieron que genotipificar nuevamente y con ello confirmaron que su metodología generó una fidelidad del 100% en los marcadores microsatélites de *P. falciparum*. Una segunda causa sería la presencia de parásitos con genotipos diferentes (policlonales) en la muestra inicial y que al momento de la amplificación genómica, uno de los genotipos haya predominado y opacado la presencia del otro (Pompanon et al. 2005).

Una tercera causa podría deberse al uso de diferentes equipos ABI PRISM 3100, ya que la genotipificación inicial (información proveniente de otro proyecto) se realizó con un equipo en Perú, mientras que la genotipificación final (información proveniente de esta tesis) se dio en un equipo en Estados Unidos. Ambos equipos mostraron diferencias en sus corridas de la electroforesis capilares, por lo tanto, es probable que ciertos marcadores hayan tenido sesgos en la asignación del alelo al momento de normalizar los valores de los controles usados tanto con el equipo de Perú y Estados Unidos (Pompanon et al. 2005). En un caso hipotético en que la genotipificación final se hubiese realizado con el mismo equipo que se usó en Perú para la genotipificación final, es posible que los marcadores microsatélites de algunas muestras no hayan presentado variación en su tamaño, y, por lo tanto, el porcentaje de alelos que no sufrieron variación en su tamaño sea mayor del 97.22%.

7.4. Aplicación del método SWGA optimizado en ADN de muestras de campo

El protocolo SWGA optimizado en esta tesis permitió que en el 80% del ADN de las 20 muestras de campo incrementen sus concentraciones hasta más 1200 moléculas/ μ L, la falla en el resto pudo haberse debido a la calidad de la muestra inicial, ya que estas estuvieron almacenadas por un largo periodo y es muy probable que los sitios de hibridación de los cebadores se hayan degradado, con lo que también habría contribuido a que se tengan datos perdidos en un ~3% del total de alelos. La degradación del ADN se confirmó al realizar la corrida electroforética de los productos SWGA, tanto del ADN almacenado (-20°C) de las 20 muestras de campo (Figura 50) como las del panel de muestras simuladas de ADN (Figura 51). En las primeras (muestras de campo) se evidenciaron barridos que nos indicaron que las muestras iniciales estuvieron degradadas y por ende se generaron secuencias de pequeños tamaños (< 10 Kb). Caso muy contrario sucedió en las muestras del panel (*mock samples*), que no estaban degradadas y que luego de realizarse la amplificación genómica se observaron bandas muy cercanas a los 23 Kb.

Muestras con ADN degradado a menudo presentan pérdida de alelos o ineficiencia en un método molecular, lo que induce a que se pierdan datos (McCord et al. 2011); además que Cowell et al (2017) enfatizaron que el método SWGA requiere inicialmente cadenas largas de ADN genómico (no degradado) para un eficiente enriquecimiento genómico y en ADN degradado es muy probable que no se sinteticen tamaños grandes de ADN y exista un mayor sesgo en la amplificación.

Es posible que el hecho de no haberse detectado ADN parasitario por medio del PCR tiempo real (qPCR), en algunas muestras, no signifique que no se hayan generado copias del genoma de *P. vivax* luego de la amplificación genómica, ya que, en ciertas muestras, que tuvieron una concentración de 0 moléculas/ μ L por medio del qPCR, amplificaron los marcadores microsatélites e incluso manteniendo el 100% de identidad. Más aún, no se llegó a la correlación de que a una mayor concentración final de ADN parasitario se asegure un 100% de identidad en todos sus marcadores, después del SWGA. Estos resultados también nos mostrarían que la amplificación genómica no fue homogénea en el ADN almacenado de las 20 muestras de campo, ya que el número de copias de ciertas secuencias de ADN estarían en mayor cantidad que otras y que al momento de diluir las muestras, para luego cuantificarse por medio del qPCR, la cantidad de moléculas de dichas secuencias sea tan bajas que no son detectadas. Esta última hipótesis también se observó en el trabajo de Ellegaard et al. (2013) ya que solo hubo éxito en el PCR de 2 de 3 marcadores (batR, gltA, 16S) en la muestra con la menor concentración de ADN genómico de *B. australis* (dilución 10^{-7} : ~ 0.0000034 ng) luego que esta se sometiera a una amplificación genómica. En el trabajo de Cowell et al. (2017) se mostró que la representatividad de cada cromosoma era variable luego de darse la amplificación genómica, e incluso diferentes muestras tuvieron diferentes resultados para un mismo cromosoma.

Se detectó también en esta tesis la presencia de ADN en los controles negativos luego de realizar la amplificación genómica, incluso mostrando productos con tamaños

similares a los que produjeron otras muestras que sí tuvieron ADN inicial (Figura 50: carril Blan; figura 51: carriles B_1 y B_2); a pesar de esto, no se detectó la presencia de ADN parasitario ni humano por medio de PCR tiempo real, por lo cual el ADN presente en los controles negativos sería un producto inespecífico. Resultado similar se encontró en el trabajo de Holbrook et al. (2005) donde se observó una banda intensa en el gel de electroforesis correspondiente al pocillo del control negativo (sin ADN inicial), luego de darse la amplificación genómica (16 horas de incubación). Se cree que es posible encontrar ADN contaminante endógeno en las phi29 polimerasas comerciales, que derivarían del vector de expresión e incluso detectándose la presencia de ADN de *E. coli* en los productos de una reacción de amplificación genómica (Blainey y Quake, 2011). En la propia información del *kit* GenomiPhi se muestra que en los controles negativos (sin ADN inicial) se generaron entre 0 – 0.5 µg de ADN con tan solo 1.5 horas de incubación. Es probable que, a mayor tiempo de incubación, dicha cantidad de ADN sea mucho mayor (illustra™ nucleic acid amplification, GE Life sciences).

Finalmente, en esta tesis se logró optimizar el método SWGA mediante la modificación de las condiciones del ciclado y componentes (indicado en la primera parte de la discusión). Como primera prueba de su aplicación en ADN almacenado (-20°C) de 20 muestras de campo, se han recuperado aquellas almacenadas por un largo periodo y/o con bajo contenido de ADN parasitario; incluso los marcadores microsatélites amplificaron exitosamente casi en su totalidad y sin variaciones en su tamaño. Estos resultados abren la posibilidad de que posteriores muestras, con las mismas características anteriormente citadas y sometidas al método SWGA optimizado, sean incluidas en los estudios genéticos y que se puedan utilizar otros marcadores (SNPs) o el secuenciamiento del genoma completo (WGS por sus siglas en inglés).

8. CONCLUSIONES

- a. Se generó exitosamente un panel con 13 muestras simuladas de ADN (*mock samples*) que contenía diferentes concentraciones de ADN de *Plasmodium vivax*, llegando a concentraciones de ~ 0.2 moléculas/ μ L.
- b. Se logró optimizar el método SWGA, teniendo nuevas condiciones del ciclado y componentes.
- c. La concentración mínima de ADN parasitario (moléculas/ μ L) para una amplificación exitosa (≥ 1200 moléculas/ μ L) fue 1.29 moléculas/ μ L.
- d. Luego de la aplicación del método SWGA optimizado, se obtuvo un 97.22% de igualdad en todos los marcadores y un 3.57% de datos perdidos.
- e. El 80% del ADN almacenado de las muestras de campo (16 de 20) tuvieron un enriquecimiento genómico exitoso (>1200 moléculas/ μ L).

9. RECOMENDACIONES

- a. Realizar el secuenciamiento del genoma completo de los productos SWGA provenientes de las muestras de campo y del panel, con el fin de determinar si existe incremento del número de *reads* que mapean el genoma de referencia, la mejora de la cobertura y porcentaje del genoma de *P. vivax*.
- b. Secuenciar los productos de PCR para determinar si hay la introducción de mutaciones en los marcadores.
- c. Aplicar el método SWGA optimizado en ADN fresco (no almacenado y con sospecha de degradación) con el fin de determinar si se repite el mismo patrón obtenido con las muestras de campo que se utilizaron en esta tesis.
- d. Corroborar qué volumen final de reacción SWGA es el ideal para una mejora en la producción de ADN parasitario.
- e. Calcular el límite de detección 95 (LOD95) para tener con mayor certeza la concentración mínima necesaria.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNOTT, Alicia; BARRY, Alyssa E.; REEDER, John C. Understanding the population genetics of *Plasmodium vivax* is essential for malaria control and elimination. *Malaria journal* [en línea]. 2012, vol. 11, no 1, p. 1-10.

AUBURN, Sarah; MARFURT, Jutta; MASLEN, Gareth; CAMPINO, Susana; RUBIO, Valentin R.; MANSKE, Magnus; MACHUNTER, Barbara; KENANGALEM, Enny; NOVIYANTI, Rintis; TRIANTY, Leily; SEBAYANG, Boni; WIRJANATA, Grennady; SRIPRAWAT, Kanlaya; ALCOCK, Daniel; MACINNIS, Bronwyn; MIOTTO, Olivo; CLARK, Taane G.; RUSSELL, Bruce; ANSTEY, Nicholas M.; NOSTEN, Francois; KWIATKOWSKI, Dominic P.; PRICE, Ric N. Effective preparation of *Plasmodium vivax* field isolates for high-throughput whole genome sequencing. *PLoS One* [en línea]. 2013, vol. 8, no 1, p 1-10.

AUBURN, Sarah; CAMPINO, Susana; CLARK, Taane G.; DJIMDE, Abdoulaye A.; ZONGO, Issaka; PINCHES, Robert; MANSKE, Magnus; MANGANO, Valentina; ALCOCK, Daniel; ANASTASI, Elisa; MASLEN, Gareth; MACINNIS, Bronwyn; ROCKETT, Kirk; MODIANO, David; NEWBOLD, Christopher I.; DOUMBO, Ogobara K.; OUÉDRAOGO, Jean B.; KWIATKOWSKI, Dominic P. An effective method to purify *Plasmodium falciparum* DNA directly from clinical blood samples for whole genome high-throughput sequencing. *PloS one* [en línea]. 2011, vol. 6, no 7, p. 1-8.

BALDEVIANO, G. Christian; OKOTH, Sheila A.; ARROSPIDE, Nancy; GONZALEZ, Rommell V.; SÁNCHEZ, Juan. F.; MACEDO, Silvia; CONDE, Silvia; TAPIA, L. Lorena; SALAS, Carolina; GAMBOA, Dionicia; HERRERA, Yeni; EDGEL, Kimberly; UDHAYAKUMAR, Venkatachalam; LESCANO, Andrés. Molecular epidemiology of *Plasmodium falciparum* malaria outbreak, Tumbes, Peru, 2010–2012. *Emerging infectious diseases*. 2015, vol. 21, no 5, p. 797-802.

BLAINEY, Paul C.; QUAKE, Stephen R. Digital MDA for enumeration of total nucleic acid contamination. *Nucleic acids research* [en línea]. 2011, vol. 39, no 4, p. 1-9.

BRIGHT, A. Taylor; TEWHEY, Ryan; ABELES, Shira; CHUQUIYAURI, Raul; LLANOS-CUENTAS, Alejandro; FERREIRA, Marcelo U.; SCHORK, Nicholas; VINETZ, Joseph; WINZELER, Elizabeth A. Whole genome sequencing analysis of *Plasmodium vivax* using whole genome capture. *BMC genomics* [en línea]. 2012, vol. 13, no 1, p. 1-9.

BROEDERS, S; HUBER, I.; GROHMANN, L.; BERBEN, G.; TAVERNIERS, I.; MAZZARA, M.; ROOSENS, N.; MORISSET, D. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends in Food Science & Technology*. 2014, vol. 37, no 2, p. 115-126.

CARLTON, Jane M.; ADAMS, John H.; Silva, Joana C.; BIDWELL, Shelby. L.; LORENZI, Hernan; CALER, Elisabet; CRABTREE, Jonathan; ANGIUOLI, Samuel; MERINO, Emilio; AMEDEO, Paolo; CHENG, Qin; COULSON, Richard; CRABB, Brendan; DEL PORTILLO, Hernando; ESSIEN, Kobby; FELDBLYUM, Tamara; FERNANDEZ-BECERRA, Carmen; GILSON, Paul; GUEYE, Amy; GUO, Xiang; KANG'A, Simon; KOUIJ, Taco; KORSINCZKY, Michael; MEYER, Esmeralda; NENE, Vish; PAULSEN, Ian; WHITE, Owen; RALPH, Stuart; REN, Qinghu; SARGEANT, Tobias; SALZBERG, Steven; STOECKERT, CHRISTIAN; SULLIVAN, Steven;

YAMAMOTO, Marcio; HOFFMAN, Stephen; WORTMAN, Jennifer; GARDNER, Malcolm; GALINSKI, Mary; BARNWELL, John; FRASER-LIGGETT, Claire. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature*. 2008, vol. 455, no 7214, p. 757-763.

CARRASCO-ESCOBAR, Gabriel; MIRANDA-ALBAN, Julio; FERNANDEZ-MIÑOPE, Carlos; BROUWER, Kimberly C.; TORRES, Kimberly; CALDERON, Maritza; GAMBOA, Dionicia; LLANOS-CUENTAS, Alejandro; VINETZ, Joseph M. High prevalence of very-low *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasitaemia carriers in the Peruvian Amazon: insights into local and occupational mobility-related transmission. *Malaria journal* [en línea]. 2017, vol. 16, no 1, p. 1-15.

COWELL, Annie N.; LOY, Dorothy E.; SUNDARARAMAN, Sesh A.; VALDIVIA, Hugo; FISCH, Kathleen; LESCANO, Andres G.; BALDEVIANO, G. Christian; DURAND, Salomon; GERBASI, Vince; SUTHERLAND, Colin J.; NOLDER, Debbie; VINETZ, Joseph M.; HAHN, Beatrice H.; WINZELER, Elizabeth. Selective whole-genome amplification is a robust method that enables scalable whole-genome sequencing of *Plasmodium vivax* from unprocessed clinical samples. *MBio* [en línea]. 2017, vol. 8, no 1, p. 1-15.

DELGADO-RATTO, Christopher; GAMBOA, Dionicia; SOTO-CALLE, Veronica E.; VAN DEN EEDE, Peter; TORRES, Eliana; SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, Luis; CONTRERAS-MANCILLA, Juan; ROSANAS-URGELL, Anna; RODRIGUEZ, Hugo; LLANOS-CUENTAS, Alejandro; ERHART, Annette; VAN, Jean-Pierre; D' ALESSANDRO, Umberto. Population genetics of *Plasmodium vivax* in the Peruvian Amazon. *PLoS neglected tropical diseases* [en línea]. 2016, vol. 10, no 1, p 1-23.

ELLEGAARD, Kirsten M.; KLASSON, Lisa; ANDERSSON, Siv G. Testing the reproducibility of multiple displacement amplification on genomes of clonal endosymbiont populations. *PloS one* [en línea]. 2013, vol. 8, no 11, p 1-16

GARMENDIA, Cristina; BERNAD, Antonio; ESTEBAN, José A.; BLANCO, Luis; SALAS, Margarita. The bacteriophage phi 29 DNA polymerase, a proofreading enzyme. *Journal of Biological Chemistry*. 1992, vol. 267, no 4, p. 2594-2599.

GOLDSTEIN, D. B.; SCHLÖTTERER, C. Microsatellites: evolution and applications. 1999. New York: Oxford University Press Inc.

HEID, Christian A.; STEVENS, Junko; LIVAK, Kenneth J.; WILLIAMS, P. Mickey. Real time quantitative PCR. *Genome research*. 1996, vol. 6, no 10, p. 986-994.

HOLBROOK, Jennifer F.; STABLEY, Deborah; SOL-CHURCH, Katia. Exploring whole genome amplification as a DNA recovery tool for molecular genetic studies. *Journal of biomolecular techniques: JBT*. 2005, vol. 16, no 2, p. 125-133

HOLLAND, Pamela M.; ABRAMSON, Richard D.; WATSON, Robert; GELFAND, David H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3'exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991, vol. 88, no 16, p. 7276-7280.

IMWONG, M.; SUDIMACK, D.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; OSORIO, L.; CARLTON, J. M.; DAY, N. P.; WHITE, N. J.; ANDERSON, T. J. Microsatellite variation, repeat array length, and population history of *Plasmodium vivax*. *Molecular Biology and Evolution*. 2006, vol. 23, no 5, p 1016-1018.

KARUNAWEEERA, N. D.; FERREIRA, M. U.; HARTL, D. L.; WIRTH, D. F. Fourteen polymorphic microsatellite DNA markers for the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Molecular Ecology Notes*. 2007, vol. 7, no 1, p. 172-175.

KRALIK, Petr; RICCHI, Matteo. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. *Frontiers in microbiology* [en línea]. 2017, vol. 8, p. 1-9.

KREIER, Julius P. *Malaria: Immunology and Immunization*. 1era edición. Academic Press. 1980, p. 137-141, ISBN: 978-0-12-426103-7.

Laboratory Services Section – Austin. Standardized Protocol for Method Validation/Verification. [en línea], p.1-38. Disponible en: <https://dokumen.tips/documents/standardized-protocol-for-method-protocol-for-method-validationverification.html> [Accedido 13 Jul. 2019].

LEICHTY, Aaron R.; BRISSON, Dustin. Selective whole genome amplification for resequencing target microbial species from complex natural samples. *Genetics*. 2014, vol. 198, no 2, p. 473-481.

LO, Eugenia; ZHOU, Guofa; OO, Winny; AFRANE, Yaw; GITHEKO, Andrew; YAN, Guiyun. Low parasitemia in submicroscopic infections significantly impacts malaria diagnostic sensitivity in the highlands of Western Kenya. *PloS one* [en línea]. 2015, vol. 10, no 3, p. 1-15.

MANGOLD, Kathy A.; MANSON, Rebecca U.; KOAY, Evelyn S.; STEPHENS, Lindsey; REGNER, MaryAnn; THOMSON, Richard B.; PETERSON, Lance R.; KAUL, Karen L. Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp. *Journal of clinical microbiology*. 2005, vol. 43, no 5, p. 2435-2440.

MANRIQUE VALVERDE, Paulo Cesar. “Epidemiología molecular de *Plasmodium vivax* en cuatro comunidades ribereñas del distrito de Mazán en la Amazonía peruana”. Asesora: Dionicia Gamboa Vilela. Tesis para optar el grado de Magister, Mención: Bioquímica y Biología Molecular. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Escuela de Post-Grado, Lima-Perú, 2018.

MCCORD, Bruce; OPEL, Kerry; FUNES, Marible; ZOPPIS, Silvia; MEADOWS, Lee. An investigation of the effect of DNA degradation and inhibition on PCR amplification of single source and mixed forensic samples. *National Criminal Justice References Report* [en línea]. 2011, no 236692, p. 1-65.

MELNIKOV, Alexandre; GALINSKY, Kevin; ROGOV, Peter; FENNELL, Timothy; VAN, Daria; RUSS, Carsten; DANIELS, Rachel; BARNES, Kayla; BOCHICCHIO, James; NDIAYE, Daouda; SENE, Papa; WIRTH, Dyann; NUSBAUM, Chad; VOLKMAN, Sarah; BIRREN, Bruce; GNIRKE, Andreas; NEAFSEY, Daniel. Hybrid selection for sequencing pathogen genomes from clinical samples. *Genome biology* [en línea]. 2011, vol. 12, no 8, p. 1-9.

MIRANDA ALBAN, Julio Jorge. "Análisis de la diversidad genética y estructura genético - poblacional de *Plasmodium vivax* en Santa Emilia (Iquitos, Loreto) a partir de marcadores microsatélites". Asesores: Dionicia Gamboa Vilela, Mónica Arakaki Makishi. Tesis para optar el título de Biólogo Genetista Biotecnólogo. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, Lima-Perú, 2017.

MOLECULAR MODULE. Leukocyte depletion of whole blood using CF11 columns v1.2. WWARN Procedure [en línea]. 2011, p. 4-10.

MUELLER, Ivo; GALINSKI, Mary R.; BAIRD, J. Kevin; CARLTON, Jane M.; KOCHAR, Dhanpat K.; ALONSO, Pedro L.; DEL PORTILLO, Hernando A. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. The Lancet infectious diseases. 2009, vol. 9, no 9, p. 555-566.

NAIR, Shalini; NKHOMA, Standwell C.; SERRE, David; ZIMMERMAN, Peter A.; GORENA, Karla; DANIEL, Benjamin J.; NOSTEN, Francois; ANDERSON, Timothy J.; & CHEESEMAN, Ian H. Single-cell genomics for dissection of complex malaria infections. Genome research. 2014, vol. 24, no 6, p. 1028-1038.

OYOLA, Samuel O.; ARIANI, Cristina V.; HAMILTON, William L.; KEKRE, Mihir; AMENGA-ETEGO, Lucas N.; GHANSAH, Anita; RUTLEDGE, Gavin G.; REDMOND, Seth; MANSKE, Magnus; JYOTHI, Dushyanth; JACOB, Chris G.; OTTO, Thomas D.; ROCKETT, Kirk; NEWBOLD, Chris I.; BERRIMAN, Matthew; KWIATKOWSKI, Dominic. Whole genome sequencing of *Plasmodium falciparum* from dried blood spots using selective whole genome amplification. Malaria journal [en línea]. 2016, vol. 15, no 1, p. 1-12.

OYOLA, Samuel O.; MANSKE, Magnus; CAMPINO, Susana; CLAESSENS, Antoine; HAMILTON, William L.; KEKRE, Mihir; DRURY, Eleanor; MEAD, Daniel; GU, Yong; MILES, Alistair; MACLNNIS, Bronwyn; NEWBOLD, Chris; BERRIMAN, Matthew; KWIATKOWSKI, Dominic P. Optimized whole-genome amplification strategy for extremely AT-biased template. DNA research. 2014, vol. 21, no 6, p. 661-671.

PEARSON, Richard D.; AMATO, Roberto; BURN, Sarah; MIOTTO, Olivo; ALMAGRO-GARCIA, Jacob; AMARATUNGA, Chanaki; SUON, Seila; MAO, Sivanna; NOVIYANTI, Rintis; TRIMARSANTO, Hidayat; MARFURT, Jutta; ANSTEY, Nicholas M.; WILLIAM, Timothy; BONI, Maciej; DOLECEK, Christine; HIEN, Tinh; WHITE, Nicholas; MICHON, Pascal; SIBA, Peter; TAVUL, Livingstone; HARRISON, Gabrielle; BARRY, Alyssa; MUELLER, Ivo; FERREIRA, Marcelo; KARUNAWEEERA, Nadira; RANDRIANARIVELOJOSIA, Milijaona; GAO, Qi; HUBBART, Christina; HART, Lee; JEFFERY, Ben; DRURY, Eleanor; MEAD, Daniel; KEKRE, Mihir; CAMPINO, Susana; MANSKE, Magnus; CORNELIUS, Victoria; MACLNNIS, Bronwyn; ROCKETT, Kirk; MILES, Alistair; RAYNER, Julian; FAIRHURST, Rick; NOSTEN, Francois; PRICE, Ric; KWIATKOWSKI, Dominic P. Genomic analysis of local variation and recent evolution in *Plasmodium vivax*. Nature genetics. 2016, vol. 48, no 8, p. 959-964.

POMPANON, Francois; BONIN, Aurélie; BELLEMAIN, Eva; TABERLET, Pierre. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. Nature Reviews Genetics. 2005, vol. 6, no 11, p. 847-859.

RODRÍGUEZ, Irene; LÁZARO, José M.; BLANCO, Luis; KAMTEKAR, Satwik; BERMAN, Andrea J.; WANG, Jimin; STEITZ, Thomas A.; SALAS, Margarita; DE VEGA, Miguel. A specific subdomain in ϕ 29 DNA polymerase confers both processivity and strand-displacement capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005, vol. 102, no 18, p. 6407-6412.

SCHLÖTTERER, CHRISTIAN. Genealogical inference of closely related species based on microsatellites. *Genetics Research*. 2001, vol. 78, no 3, p. 209-212.

SKERRA, Arne. Phosphorothioate primers improve the amplification of DNA sequences by DNA polymerases with proofreading activity. *Nucleic Acids Research*. 1992, vol. 20, no 14, p. 3551-3554.

SUNDARARAMAN, Sesh A.; PLENDERLEITH, Lindsey J.; LIU, Weimin; LOY, Dorothy E.; LEARN, Gerald H.; LI, Yingying; SHAW, Katharina S.; AYOUBA, Ahidjo; PEETERS, Martine; SPEEDE, Sheri; SHAW, George M; BUSHMAN, Frederic; BRISSON, Dustin; RAYNER, Julian; SHARP, Paul M.; HAHN, Beatrice H. Genomes of cryptic chimpanzee *Plasmodium* species reveal key evolutionary events leading to human malaria. *Nature communications*. 2016, vol. 7, no 1, p. 1-14.

VENKATESAN, Meera; AMARATUNGA, Chanaki; CAMPINO, Susana; AUBURN, Sarah; KOCH, Oliver; LIM, Pharath; UK, Sambunny; SOCHEAT, Duong; KWIATKOWSKI, Dominic; FAIRHURST, Rick; PLOWE, Christopher V. Using CF11 cellulose columns to inexpensively and effectively remove human DNA from *Plasmodium falciparum*-infected whole blood samples. *Malaria journal* [en línea]. 2012, vol. 11, no 1, p. 1-7

WANG, Y; NAIR, S.; NOSTEN, F.; & ANDERSON; T. J. Multiple displacement amplification for malaria parasite DNA. *The Journal of parasitology*. 2009, vol. 95, no 1, p. 253-255.

WHO. MALVAC Meeting 2004: Evaluation of Malaria Vaccines. Pre-clinical Evaluation Group: Optimizing the Developmental Pathway from the Lab to the Clinic. Report from a technical consultation at WHO/IVR Malaria Vaccine Advisory Committee meeting Montreux. 2004.

WITTEWER, Carlo T.; HERRMANN, Mark G.; MOSS, Alan A.; RASMUSSEN, Randy P. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*. 1997, vol. 22, no 1, p. 130-138.

YILMAZ, Suzan; ALLGAIER, Martin; HUGENHOLTZ, Philip. Multiple displacement amplification compromises quantitative analysis of metagenomes. *Nature methods*. 2010, vol. 7, no 12, p. 943-944.

YUAN, Chiu C.; MILEY, Wendell; WATERS, David. A quantification of human cells using an ERV-3 real time PCR assay. *Journal of virological methods*. 2001, vol. 91, no 2, p. 109-117.

11. ANEXOS

11.1. Marcadores microsatélites

Tabla 7. Marcadores microsatélites utilizados en esta tesis.

MS	Cromosoma	Inicio	Motivo de repetición	Cebador Derecho	Cebador Izquierdo	Tamaño bp	Th	[nM]	Grupo
11.162	Pv_Sal1_chr11	1859261	ATAC	6FAM - TTTGTTAGGAGATC CGTCTG	TAAATGACACTTTGG CTTCC	222	60	200	1
14.297	Pv_Sal1_chr14	2965458	AAG	PET - TACACCCTTTAGGT CCTCGT	TGAAAAATGTTCCGC TACTT	200	57	200	1
Ch2.121	Pv_Sal1_chr02	121392	TTA	NED - CCTTGCTCTCCTG GCTCTTC	GTATGAGTGACCACC CTGGC	172	67	200	1
Ch2.152	Pv_Sal1_chr02	152435	AAT	VIC - GTCATTTCTAGGC AAAGACAGC	TACGTTTCGCCATGT TCCTG	153	63	400	1
Ch14.2986	Pv_Sal1_chr14	2986814	AT	NED - TTCCTAAATAAAGC ACCATG	ACCATTCTGTTAAAA GTATGT	175	57	200	2
Ch14.3010	Pv_Sal1_chr14	3010226	AT	PET - GATAAGATAAAACA ACAATGCG	AGGATGCTTCGGTTT GCT	207	60	200	2
Ch14.3021	Pv_Sal1_chr14	3021021	TA	6FAM - GCATTTGTTACATT GTTTTCGT	GCAAGATGTGTCCTT TACA	228	57	400	2
Ch2.122	Pv_Sal1_chr02	122021	ATA	VIC - AGCTGGATTGCC TAACTGC	CGCATCATCGCATAC GCTTG	197	60	200	2
13.239	Pv_sal1_chr13	1601741	TTTA	NED - CAACAACAAAATGA ATGACG	CCTACCTTTACGCGT TTTTA	210	58	200	3
Ch14.2981	Pv_Sal1_chr14	2981291	AT	PET - CGATGAATCATTTT CGTCCGCA	ACTCTTCTTTCAGCA CTTTTGGC	161	63	400	3
MS6	Pv_Sal1_chr11	1760698	(TCC)2(TCT)3(C CT)2(TCC)2 GCTTCT(TCC)1 0	VIC - GGTCTTCGGTGA TCTCTGC	CTGTCTTGAGGACA TCAACGGGATT	241	57	200	3
MS9	Pv_Sal1_chr08	1394242	(GGA)18	6FAM - AGATGCCTACAG TTGACGA	CTGTCTTGAAGCTGC CCATGTGGTAAT	188	57	200	3
3.502	Pv_sal1_chr03	451099	AACGGATG	PET - GTGGACCGATGGA CCTAT	TCCTACTCAGGGGGA ATACT	168	55	400	4
MS15	Pv_Sal1_chr05	1110660	(TCT)10	NED - TGTTTGCAAAGGAA TCCACA	CTGTCTTCGGCCAGA TGAAAAGGATAA	243	57	400	4
MS20	Pv_Sal1_chr10	1345613	(GAA)11GAG(GA A)13(CAA)4 GAA(CAA)5	VIC - GCACAACAAATGCA AGATCC	CTGTCTTGTGGCAGT GGCTCATCTTCT	211	60	200	4
MS4	Pv_Sal1_chr06	390261	(AGT)18	6FAM - CGATTACTGTTGA CGCTGAA	CTGTCTTCAAAGGAA CATGCTCGATGA	220	57	200	4

11.2. Modificación en los componentes del mix de reacción SWGA y parámetros del SWGA

11.2.1. Variación de volumen de enzima: parte 1

Se observó que disminuyendo el volumen de enzima se obtuvo una mejor producción de ADN parasitario, obteniendo una mayor concentración final con los volúmenes de enzima de 1.5 (>1.96 veces) y 1 μL (>1.8 veces) respecto a 3 μL (Figura 20). 1 μL generó una concentración final ~ 1.45 veces mayor que 1.5 μL , a excepción de la muestra 8 que fue ~ 1.76 veces menor que 3 μL (Figura 20). Respecto al porcentaje final, no se encontró diferencia significativa entre los 3 volúmenes (Figura 21, tabla 8).

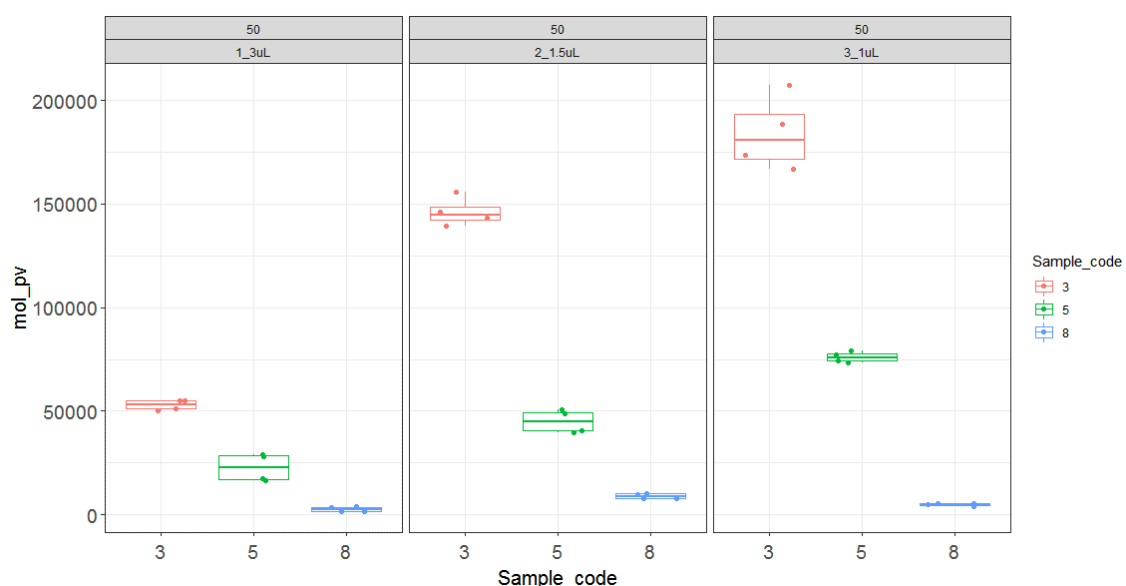


Figura 20. Cuantificación de ADN parasitario. Concentración final (moléculas/ μL) y las muestras (3, 5 y 8), cada una representada por un color distinto, en el eje “Y” y “X” respectivamente. Las concentraciones iniciales de las muestras 3, 5, y 8 fueron 297, 70, 6 moléculas/ μL , respectivamente.

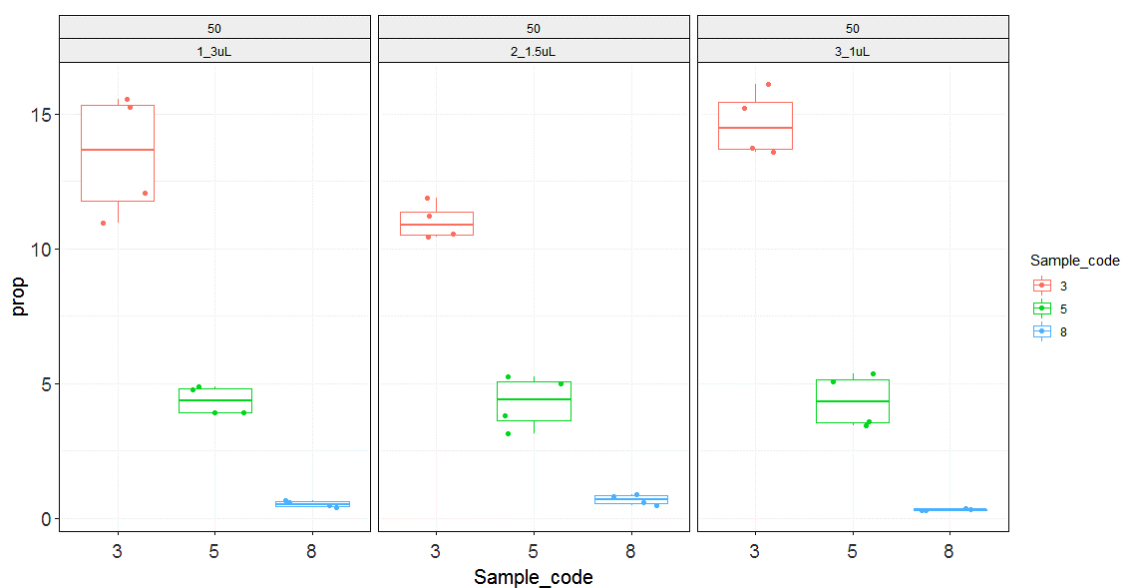


Figura 21. Porcentaje final de ADN parasitario (%) en el eje Y; y las muestras (3, 5, y 8) en el X. Los porcentajes iniciales de las muestras 3, 5, y 8 fueron 0.391, 0.100, 0.011%, respectivamente.

Tabla 8. Estadístico de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon entre los diferentes grupos para la concentración (moléculas/ μ L) y porcentaje final de ADN parasitario (%). Las regiones sombreadas indican diferencia significativa.

ADN parásito (moléculas/ μ L)		Mayor		
		3uL	1.5uL	1uL
Menor	3uL	x	0.0002441	0.0002441
	1.5uL	1	x	0.0105
	1uL	1	0.9919	x
ADN parásito (%)		Mayor		
		3uL	1.5uL	1uL
Menor	3uL	x	0.6333	0.6045
	1.5uL	0.3955	x	0.1167
	1uL	0.425	0.8982	x

11.2.2. Variación del volumen de enzima: parte 2 (confirmación)

Se confirmó que al usar 1 μ L se generó la mayor producción de ADN parasitario respecto a 1.5 μ L, habiendo diferencia significativa en la concentración final (~1.5 veces más, figura 22, tabla 9); pero, no en el porcentaje final (Figura 23, tabla 9).

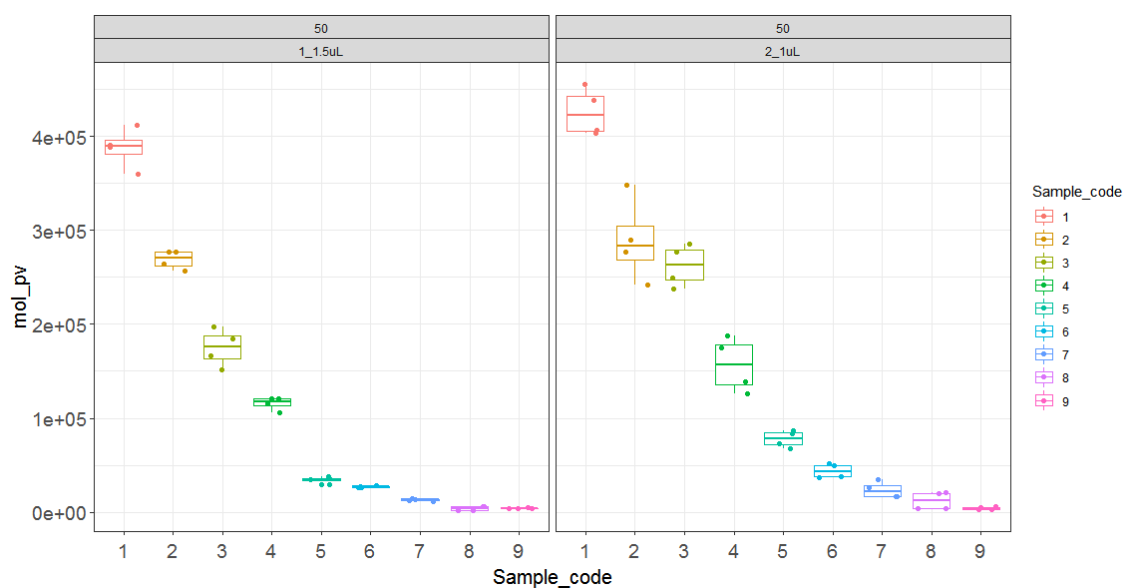


Figura 22. Cuantificación de ADN parasitario. Concentración final de ADN parasitario (moléculas/ μ L) en el eje Y; y las muestras del 1 al 9, cada una representada por un color distinto, en el eje X. Las concentraciones iniciales de cada muestra en la tabla 1.

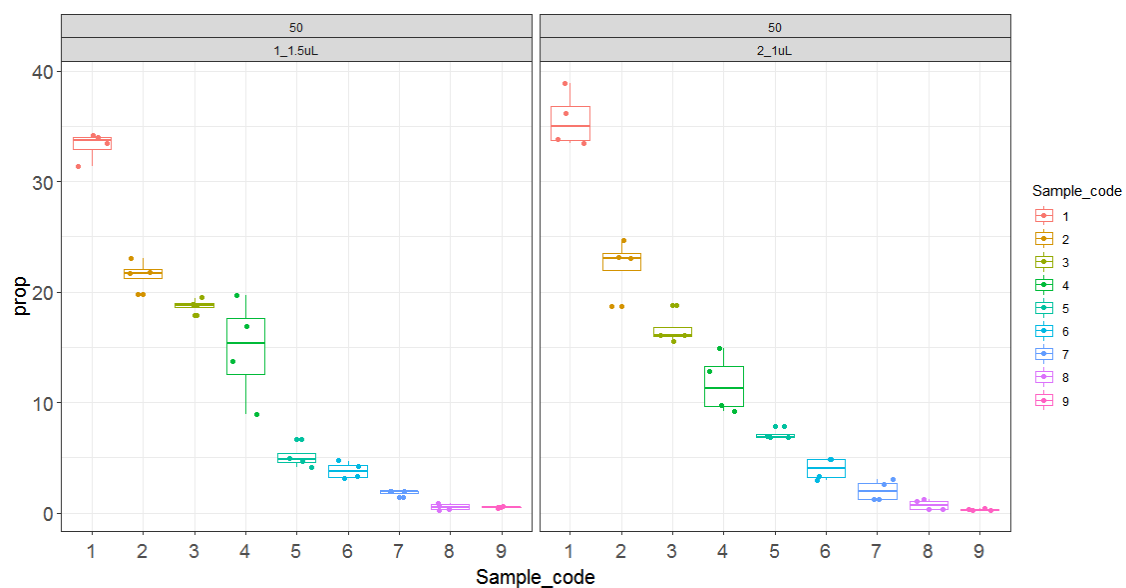


Figura 23. Porcentaje final de ADN parasitario (%) en el eje Y; y las muestras del 1 al 9, cada una representada por un color distinto, en el X. Los porcentaje iniciales de cada muestra en la tabla 1.

Tabla 9. Estadístico de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon entre los diferentes grupos para la concentración (moléculas/ μL) y porcentaje final de ADN parasitario (%). Las regiones sombreadas indican diferencia significativa.

ADN parásito (moléculas/ μL)		Mayor	
		1.5uL	1uL
Menor	1.5uL	x	2.54E-06
	1uL	1	x
ADN parásito (%)		Mayor	
		1.5uL	1uL
Menor	1.5uL	x	0.329
	1uL	0.6766	x

11.2.3. Variación del tiempo de incubación: parte 1

Se observó una diferencia significativa a las 8 horas respecto a 5 horas, donde se obtuvo una concentración final ~ 1.2 veces más; 12 horas fue similar respecto a 8 horas; y 16 horas, ~ 1.4 veces más que 12 horas (Figura 24, tabla 10). Respecto al porcentaje final, se observó el mismo patrón que la concentración final, con la diferencia que a las 12 horas sí se observó diferencia significativa respecto de las 8 horas (Figura 25, tabla 10).

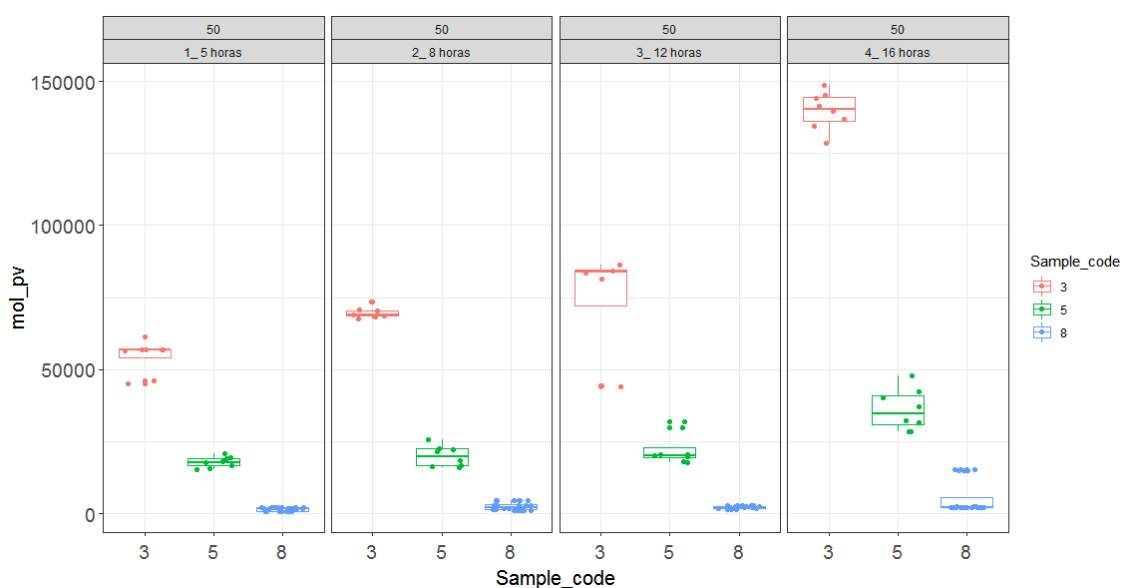


Figura 24. Cuantificación de ADN parasitario. Concentración final de ADN parasitario (moléculas/ μL) en el eje Y; y las muestras (3, 5, 8), cada una representada por un color distinto, en el eje X. Las concentraciones iniciales de las muestras 3, 5 y 8 fueron 297, 70, 6 moléculas/ μL , respectivamente.

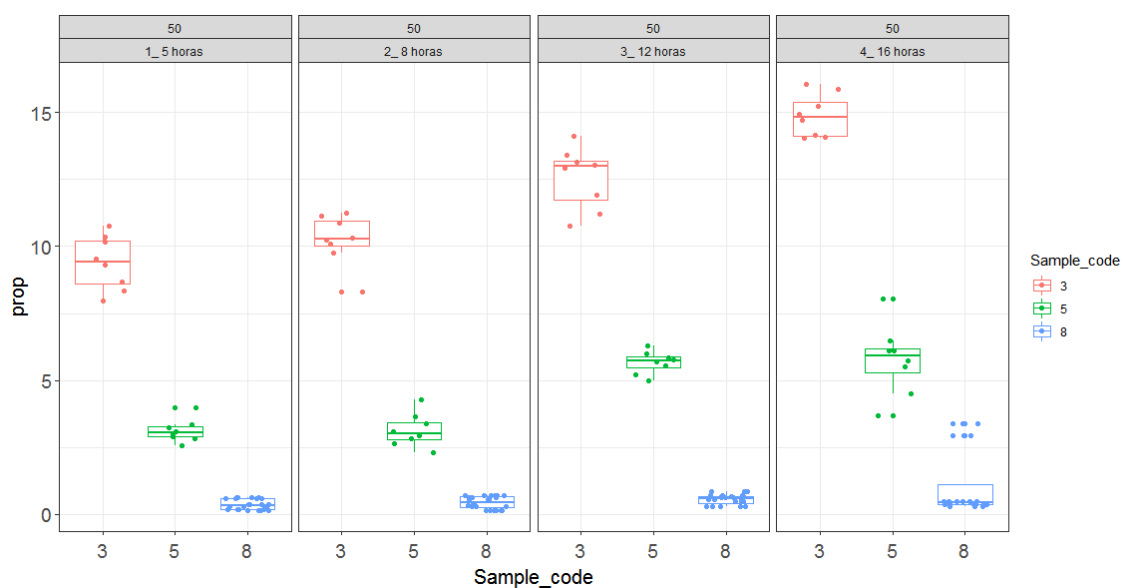


Figura 25. Porcentaje final de ADN parasitario (%) en el eje Y; y las muestras (3, 5, y 8), cada una representada por un color distinto, en el X. Los porcentajes iniciales de las muestras 3, 5 y 8 fueron 0.391, 0.100, 0.011 %, respectivamente.

Tabla 10. Estadístico de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon entre los diferentes grupos para la concentración (moléculas/ μ L) y porcentaje final de ADN parasitario (%). Las regiones sombreadas indican diferencia significativa.

ADN parásito (moléculas/ μ L)		Mayor			
		5h	8h	12h	16h
Menor	5h	x	9.29E-07	0.0001166	2.27E-11
	8h	1	x	0.05862	0.0002422
	12h	0.9999	0.9429	x	0.0002422
	16h	1	0.9998	0.9998	x
ADN parásito (%)		Mayor			
		5h	8h	12h	16h
Menor	5h	x	0.02488	1.74E-08	3.83E-05
	8h	0.9759	x	3.97E-05	0.0002422
	12h	1	1	x	0.01494
	16h	1	0.9998	0.9856	x

11.2.4. Variación del tiempo de incubación: parte 2

Se generó mucha mayor producción de ADN parasitario a 24 horas, habiendo diferencia significativa respecto a 16 horas tanto en concentración (~2.85 veces más para la muestra 4 y ~1.22 veces menos para la muestra 7; figura 26, tabla 11) como porcentaje final (~1.8 veces más para la muestra 4 y ~2.4 veces menos para la muestra 7; figura 27, tabla 11).

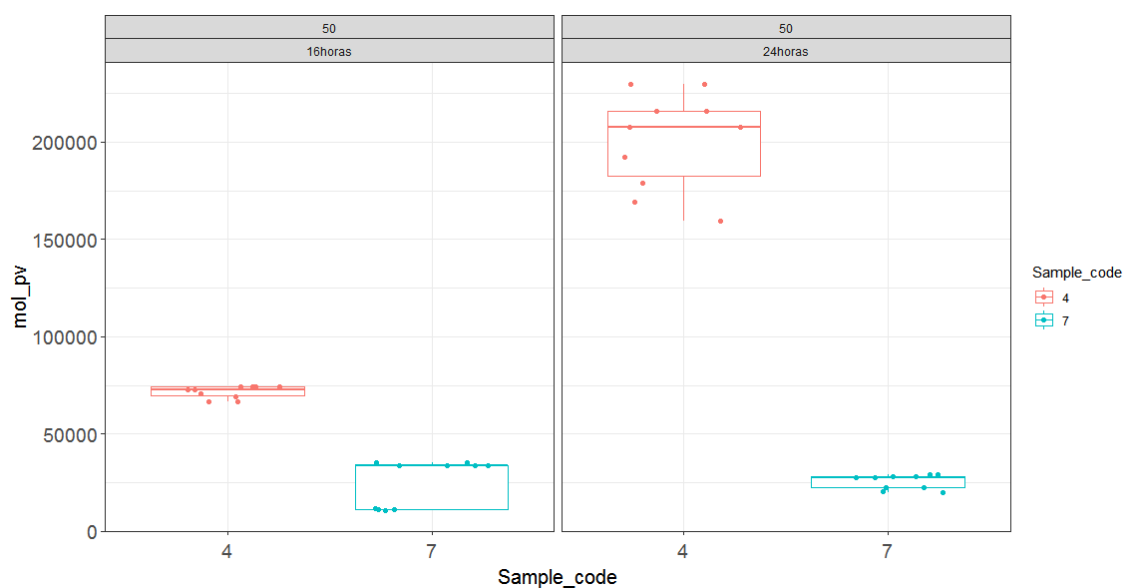


Figura 26. Cuantificación de ADN parasitario. Concentración final de ADN parasitario (moléculas/ μ L) en el eje Y; y las muestras (4 y 7), cada una representada por un color distinto, en el eje X. Las concentraciones iniciales de las muestras 4 y 7 fueron 144 y 16 moléculas/ μ L, respectivamente.

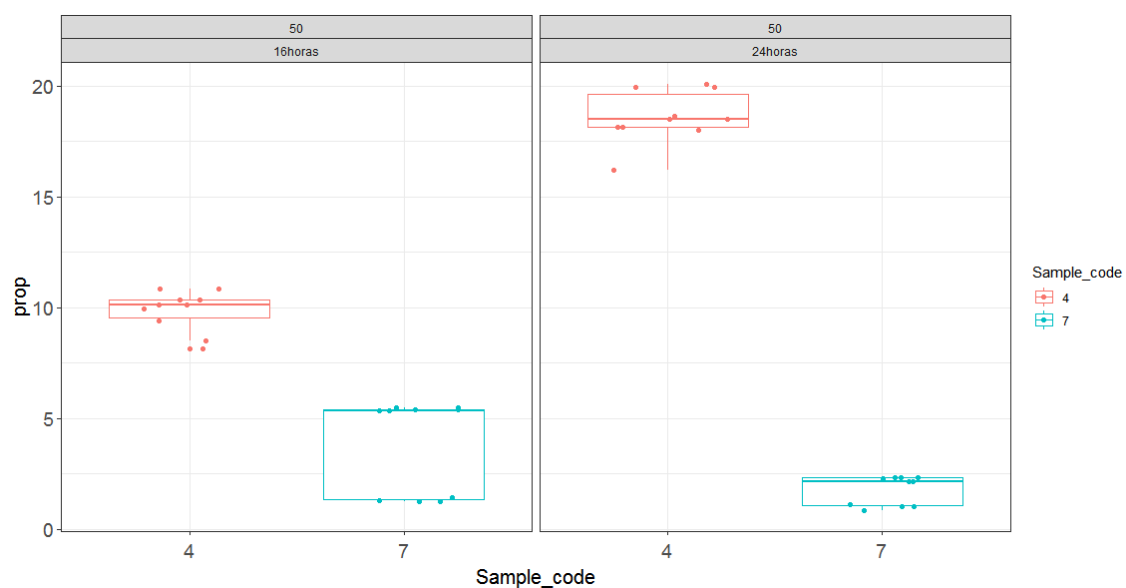


Figura 27. Porcentaje final de ADN parasitario (%) en el eje Y; y las muestras (4 y 7), cada una representada por un color distinto, en el X. Los porcentajes iniciales de las muestras 4 y 7 fueron 0.234 y 0.023 %, respectivamente.

Tabla 11. Estadístico de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon entre los diferentes grupos para la concentración (moléculas/ μ L) y porcentaje final de ADN parasitario (%). Las regiones sombreadas indican diferencia significativa.

ADN parásito (moléculas/ μ L)		Mayor	
		16h	24h
Menor	16h	x	9.08E-04
	24h	0.9992	x
ADN parásito (%)		Mayor	
		16h	24h
Menor	16h	x	3.22E-02
	24h	0.9704	x

11.2.5. Variación de la concentración final del set de cebadores pvset1

No se observó diferencia significativa entre los 3 grupos (3.4, 4.4, y 6.4 μ M) en lo que fue concentración final de ADN parasitario (Figura 28, tabla 12). Respecto al porcentaje final (Figura 29, tabla 12), la concentración de cebadores de 3.4 μ M tuvo diferencia significativa comparado con 4.4 μ M (~1.78 veces más para la muestra 4 y ~1.27 veces menos para la muestra 7) y 6.4 μ M (~1.94 veces más).

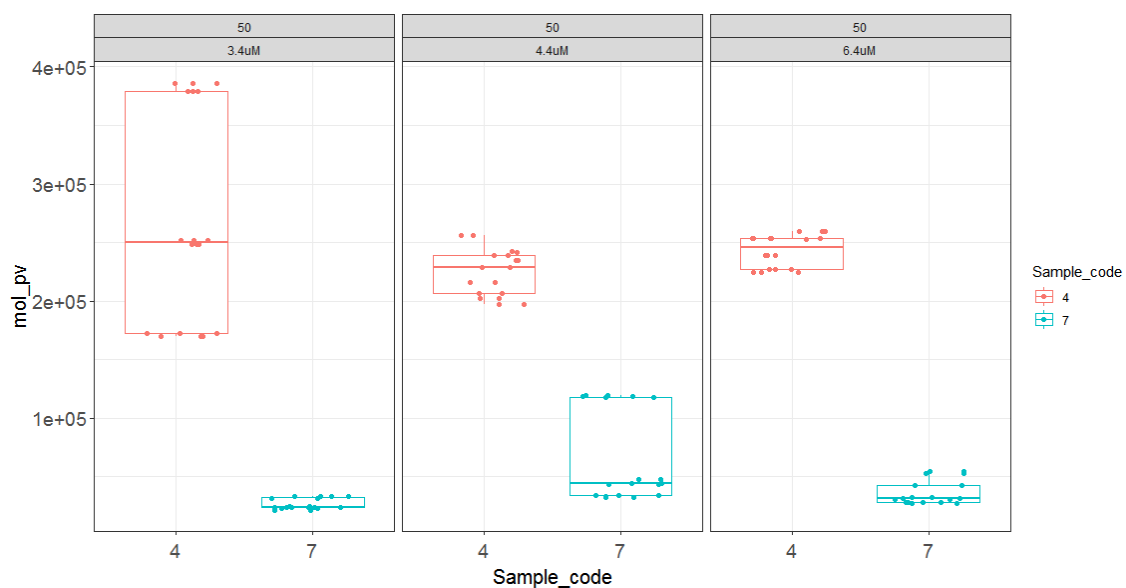


Figura 28. Cuantificación de ADN parasitario. Concentración final de ADN parasitario (moléculas/ μ L) en el eje Y; y las muestras (4 y 7), cada una representada por un color distinto, en el eje X. Las concentraciones iniciales de las muestras 4 y 7 fueron 144 y 16 moléculas/ μ L, respectivamente.

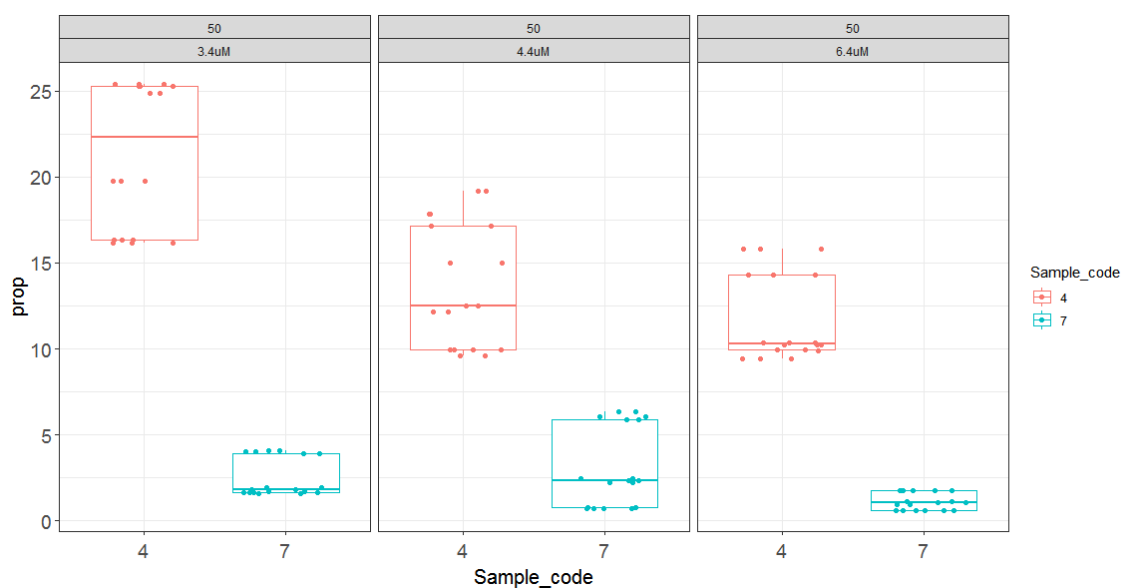


Figura 29. Porcentaje final de ADN parasitario (%) en el eje Y; y las muestras (4 y 7), cada una representada por un color distinto, en el X. Los porcentajes iniciales de las muestras 4 y 7 fueron 0.234 y 0.023 %, respectivamente.

Tabla 12. Estadístico de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon entre los diferentes grupos para la concentración (moléculas/ μ L) y porcentaje final de ADN parasitario (%). Las regiones sombreadas indican diferencia significativa.

ADN parásito (moléculas/ μ L)		Mayor		
		3.4uM	4.4uM	6.4uM
Menor	3.4uM	x	0.1831	0.08697
	4.4uM	0.821	x	0.356
	6.4uM	0.9155	0.6499	x
ADN parásito (%)		Mayor		
		3.4uM	4.4uM	6.4uM
Menor	3.4uM	x	0.9956	1
	4.4uM	0.004655	x	0.9989
	6.4uM	8.64E-08	0.001121	x

11.2.6. Variación del set de cebadores

Se observó que con el uso del pvset1920 se obtuvo mayor concentración (>1.41 veces; figura 30, tabla 13) como porcentaje final de ADN parasitario (>2.70 veces; figura 31, tabla 13) respecto al pvset1. Estas diferencias fueron significativas para ambas métricas

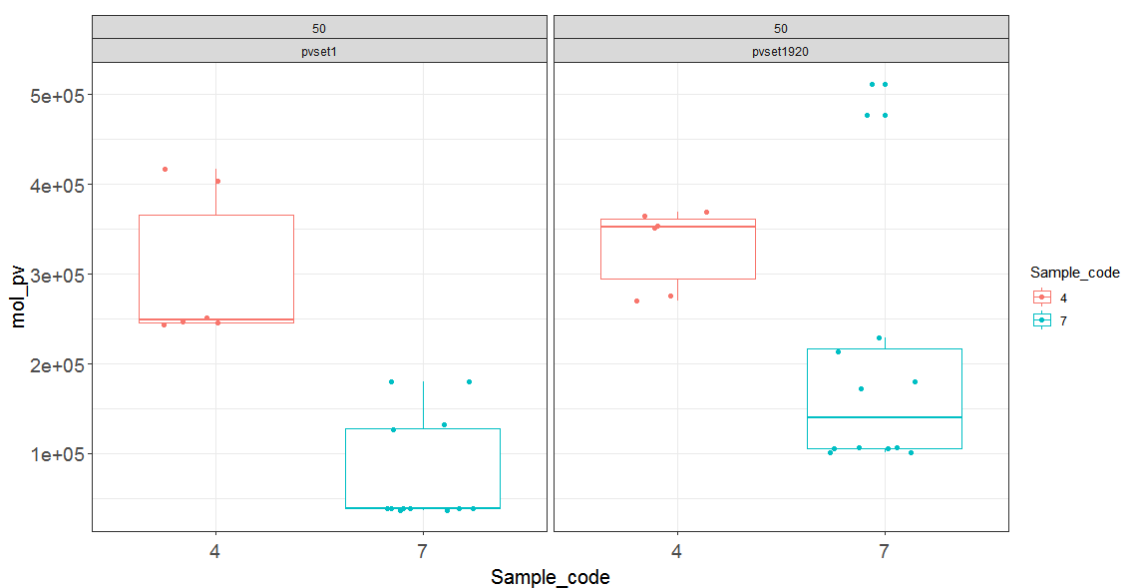


Figura 30. Cuantificación de ADN parasitario. Concentración final de ADN parasitario (moléculas/μL) en el eje Y; y las muestras (4 y 7), cada una representada por un color distinto, en el eje X. Las concentraciones iniciales de las muestras 4 y 7 fueron 144 y 16 moléculas/μL, respectivamente.

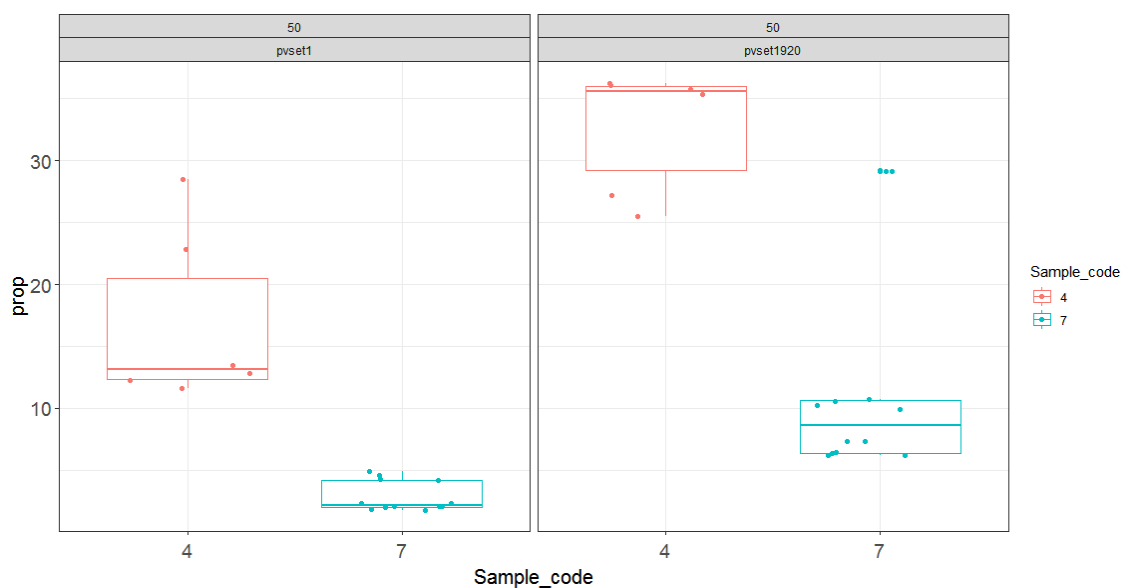


Figura 31. Porcentaje final de ADN parasitario (%) en el eje Y; y las muestras (4 y 7), cada una representada por un color distinto, en el X. Los porcentajes iniciales de las muestras 4 y 7 fueron 0.234 y 0.023 %, respectivamente.

Tabla 13. Estadístico de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon entre los diferentes grupos para la concentración (moléculas/ μ L) y porcentaje final de ADN parasitario (%). Las regiones sombreadas indican diferencia significativa.

ADN parásito (moléculas/ μ L)		Mayor	
		pvset1	pvset1920
Menor	pvset1	x	9.90E-04
	pvset1920	0.9991	x
ADN parásito (%)		Mayor	
		pvset1	pvset1920
Menor	pvset1	x	1.07E-04
	pvset1920	1.00E+00	x

11.2.7. Variación de la concentración final del set de cebador pvset1920

Se obtuvieron que las concentraciones de cebadores 4.4 y 6.4 μ M fueron significativamente mayores que 3.4 μ M en la concentración final de ADN parasitario (~ 1.39 y > 1.63 veces respectivamente); y entre aquellas dos no se determinó diferencia alguna en la misma métrica (Figura 32, tabla 14). En el porcentaje final, se vio que solo 6.4 μ M era significativamente mayor a 3.4 μ M (~ 2.12 veces más para la muestra 7 y ~ 1.16 veces menos para la muestra 4; figura 33, tabla 14). No hubo alguna otra diferencia significativa entre los demás grupos.

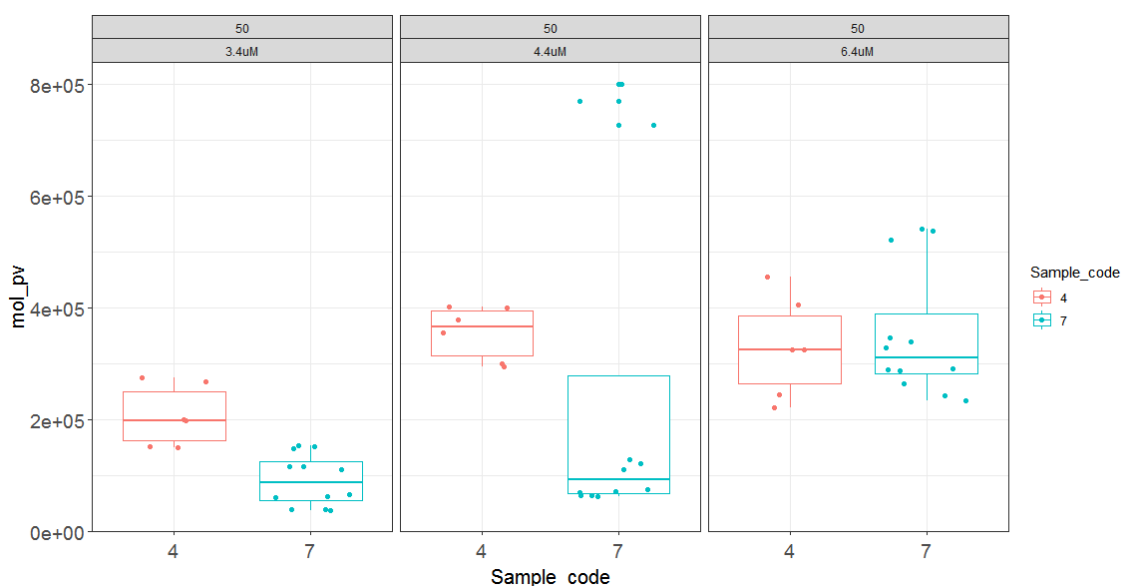


Figura 32. Cuantificación de ADN parasitario. Concentración final de ADN parasitario (moléculas/ μ L) en el eje Y; y las muestras (4 y 7), cada una representada por un color distinto, en el eje X. Las concentraciones iniciales de las muestras 4 y 7 fueron 144 y 16 moléculas/ μ L, respectivamente.

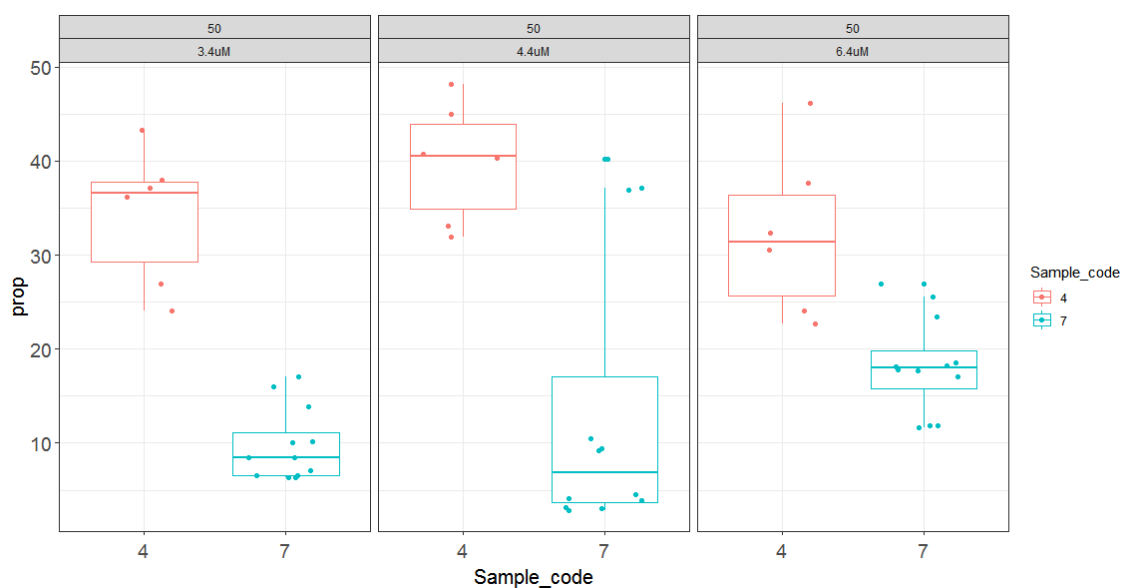


Figura 33. Porcentaje final de ADN parasitario (%) en el eje Y; y las muestras (4 y 7), cada una representada por un color distinto, en el X. Los porcentajes iniciales de las muestras 4 y 7 fueron 0.234 y 0.023 %, respectivamente.

Tabla 14. Estadístico de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon entre los diferentes grupos para la concentración (moléculas/ μ L) y porcentaje final de ADN parasitario (%). Las regiones sombreadas indican diferencia significativa.

ADN parásito (moléculas/ μ L)		Mayor		
		3.4uM	4.4uM	6.4uM
Menor	3.4uM	x	0.04071	3.82E-06
	4.4uM	0.9632	x	0.1519
	6.4uM	1	0.8581	x
ADN parásito (%)		Mayor		
		3.4uM	4.4uM	6.4uM
Menor	3.4uM	x	0.2086	0.02997
	4.4uM	0.8036	x	0.6006
	6.4uM	9.73E-01	0.4159	x

11.2.8. Variación de la concentración final de dNTPs

No se determinó diferencia alguna en las concentraciones finales de ADN parasitario entre 1.25 y 4 mM de dNTPs (Figura 34, tabla 15); sin embargo, a 4 mM de dNTPs se indujo a mucho menor porcentaje final de ADN parasitario que a 1.25 mM (~4.31 veces menos; figura 35, tabla 15, diferencia significativa).

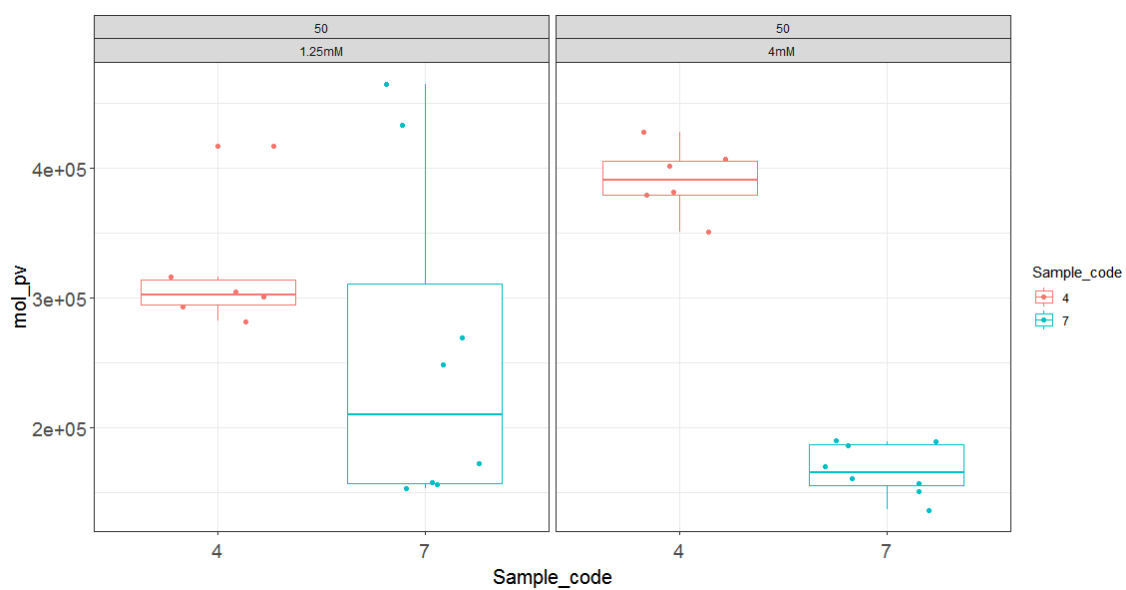


Figura 34. Cuantificación de ADN parasitario. Concentración final de ADN parasitario (moléculas/ μ L) en el eje Y; y las muestras (4 y 7), cada una representada por un color distinto, en el eje X. Las concentraciones iniciales de las muestras 4 y 7 fueron 144 y 16 moléculas/ μ L, respectivamente.

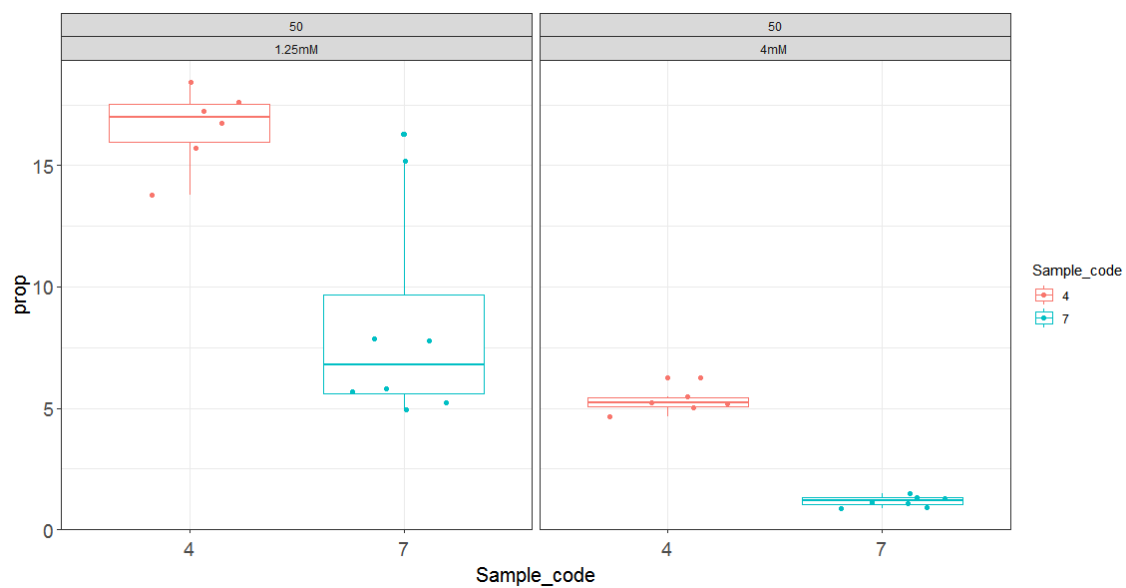


Figura 35. Porcentaje final de ADN parasitario (%) en el eje Y; y las muestras (4 y 7), cada una representada por un color distinto, en el X. Los porcentajes iniciales de las muestras 4 y 7 fueron 0.234 y 0.023 %, respectivamente.

Tabla 15. Estadístico de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon entre los diferentes grupos para la concentración (moléculas/ μ L) y porcentaje final de ADN parasitario (%). Las regiones sombreadas indican diferencia significativa.

ADN parásito (moléculas/ μ L)		Mayor	
		1.25mM	4mM
Menor	1.25mM	x	6.10E-01
	4mM	0.417	x
ADN parásito (%)		Mayor	
		1.25mM	4mM
Menor	1.25mM	x	1.00E+00
	4mM	6.10E-05	x

11.2.9. Variación del *kit* de amplificación genómica

Se determinó que utilizando el *kit* GenomiPhi se obtuvo >8.84 veces más de concentración final de ADN parasitario que el phi29 New England (diferencia significativa; figura 36, tabla 16); pero, no hubo diferencia alguna en el porcentaje final (Figura 37, tabla 16).

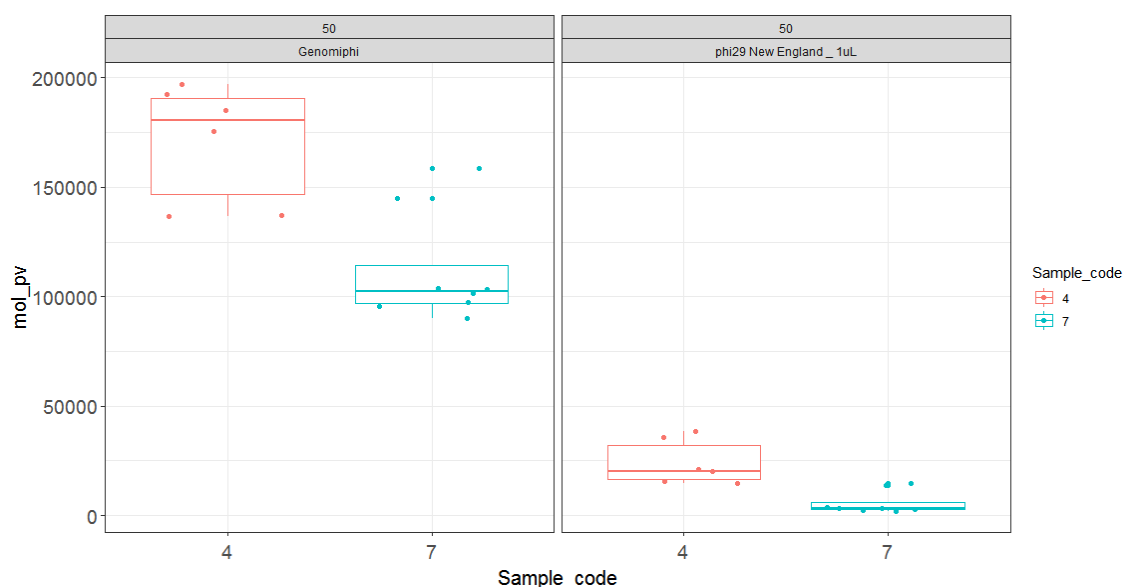


Figura 36. Cuantificación de ADN parasitario. Concentración final de ADN parasitario (moléculas/ μ L) en el eje Y; y las muestras (4 y 7), cada una representada por un color distinto, en el eje X. Las concentraciones iniciales de las muestras 4 y 7 fueron 144 y 16 moléculas/ μ L, respectivamente.

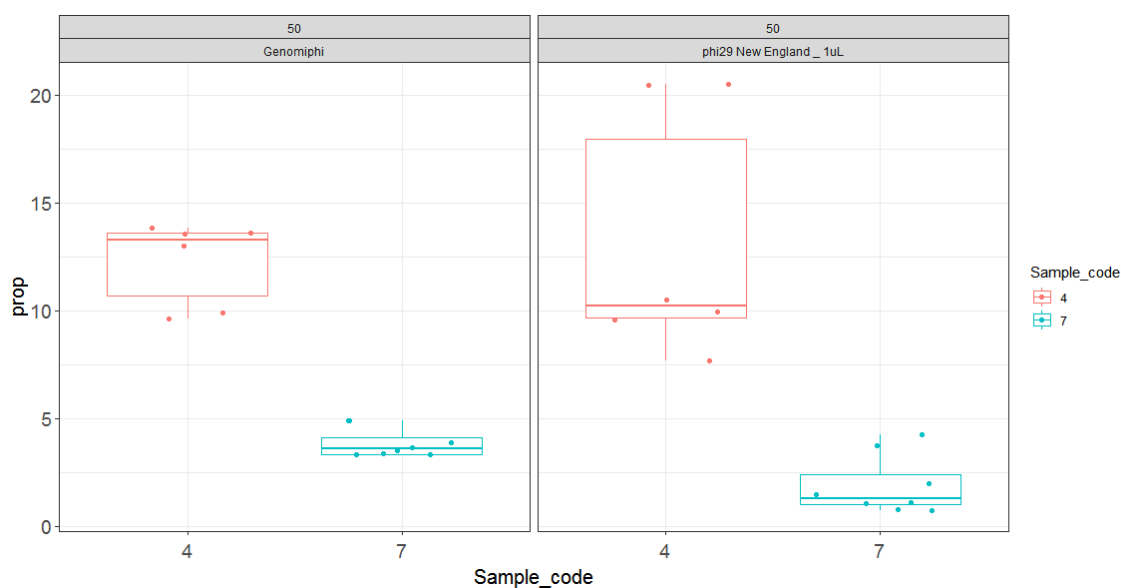


Figura 37. Porcentaje final de ADN parasitario (%) en el eje Y; y las muestras (4 y 7), cada una representada por un color distinto, en el X. Los porcentajes iniciales de las muestras 4 y 7 fueron 0.234 y 0.023 %, respectivamente.

Tabla 16. Estadístico de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon entre los diferentes grupos para la concentración (moléculas/ μ L) y porcentaje final de ADN parasitario (%). Las regiones sombreadas indican diferencia significativa.

ADN parásito (moléculas/ μ L)		Mayor	
		phi29	GenomiPhi
Menor	phi29	x	6.10E-05
	GenomiPhi	1	x
ADN parásito (%)		Mayor	
		phi29	GenomiPhi
Menor	phi29	x	8.63E-02
	GenomiPhi	0.9235	x

11.2.10. Comparación de parámetros en el *kit* phi29 New England

Se determinó que con nuestros parámetros hubo un significativo aumento, tanto de la concentración como del porcentaje final de ADN parasitario, comparado con Cowell (1 μ L: >8.47 y >7.18 veces respectivamente, 3 μ L: >19.35 y >11.99 veces respectivamente). Dentro de nuestros parámetros se encontró que utilizando 3 μ L de volumen de enzima se obtenía mayor concentración final de ADN parasitario que 1 μ L (>1.40 veces más; figura 38, tabla 17), pero, en el porcentaje final no habría diferencia significativa (Figura 39, tabla 17).

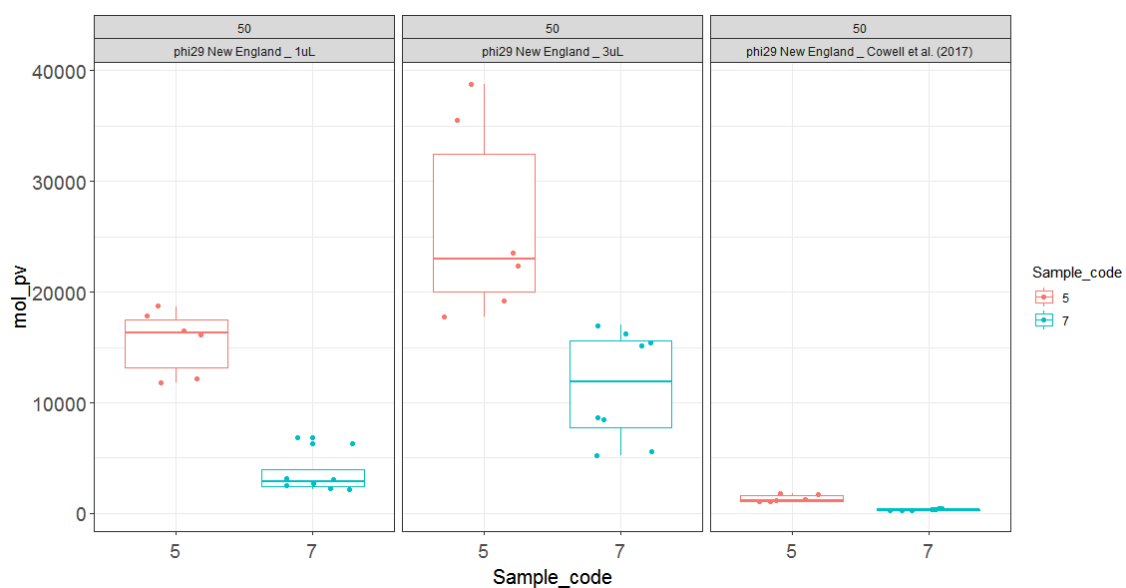


Figura 38. Cuantificación de ADN parasitario. Concentración final de ADN parasitario (moléculas/ μ L) en el eje Y; y las muestras (5 y 7), cada una representada por un color distinto, en el eje X. Las concentraciones iniciales de las muestras 5 y 7 fueron 70 y 16 moléculas/ μ L, respectivamente.

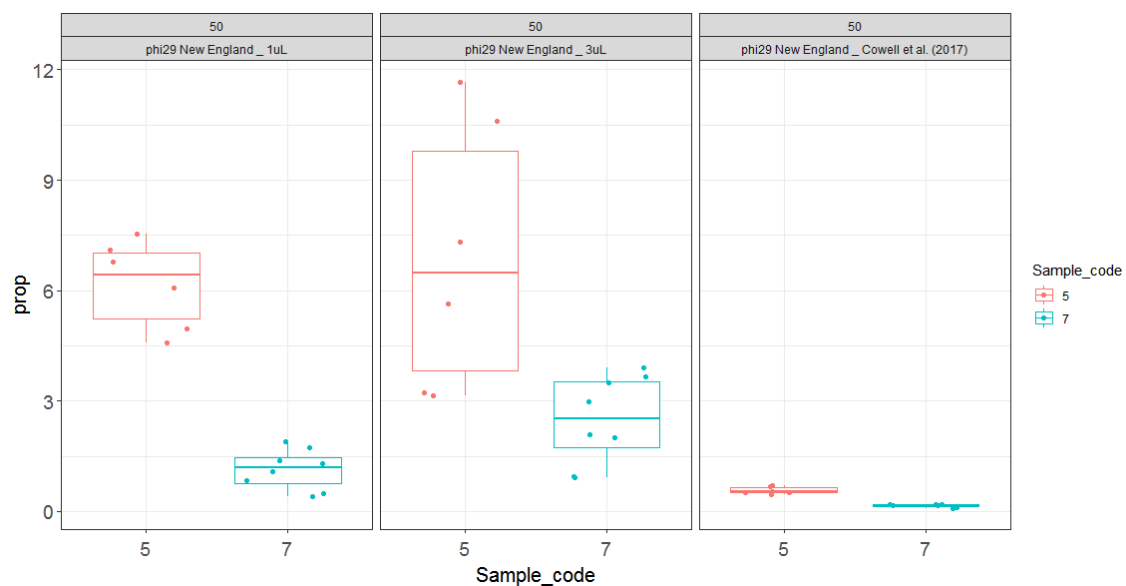


Figura 39. Porcentaje final de ADN parasitario (%) en el eje Y; y las muestras (5 y 7), cada una representada por un color distinto, en el X. Los porcentajes iniciales de las muestras 5 y 7 fueron 0.100 y 0.023 %, respectivamente.

Tabla 17. Estadístico de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon entre los diferentes grupos para la concentración (moléculas/ μ L) y porcentaje final de ADN parasitario (%). Las regiones sombreadas indican diferencia significativa.

ADN parásito (moléculas/ μ L)		Mayor		
		Cowell	phi29 (30U)	phi29 (10U)
Menor	Cowell	x	6.10E-05	6.10E-05
	phi29 (30U)	1	x	0.9991
	phi29 (10U)	1	0.00116	x
ADN parásito (%)		Mayor		
		Cowell	phi29 (30U)	phi29 (10U)
Menor	Cowell	x	6.10E-05	6.10E-05
	phi29 (30U)	1	x	0.8521
	phi29 (10U)	1	0.1629	x

11.2.11. Comparación de kits de amplificación genómica

Se determinó que utilizando el segundo *kit* se produjo mucho mayor ADN parasitario que el primer *kit* (diferencia significativa) tanto para la concentración (>5.83 veces; figura 40, tabla 18) como porcentaje final (>2.39 veces; figura 41, tabla 18).

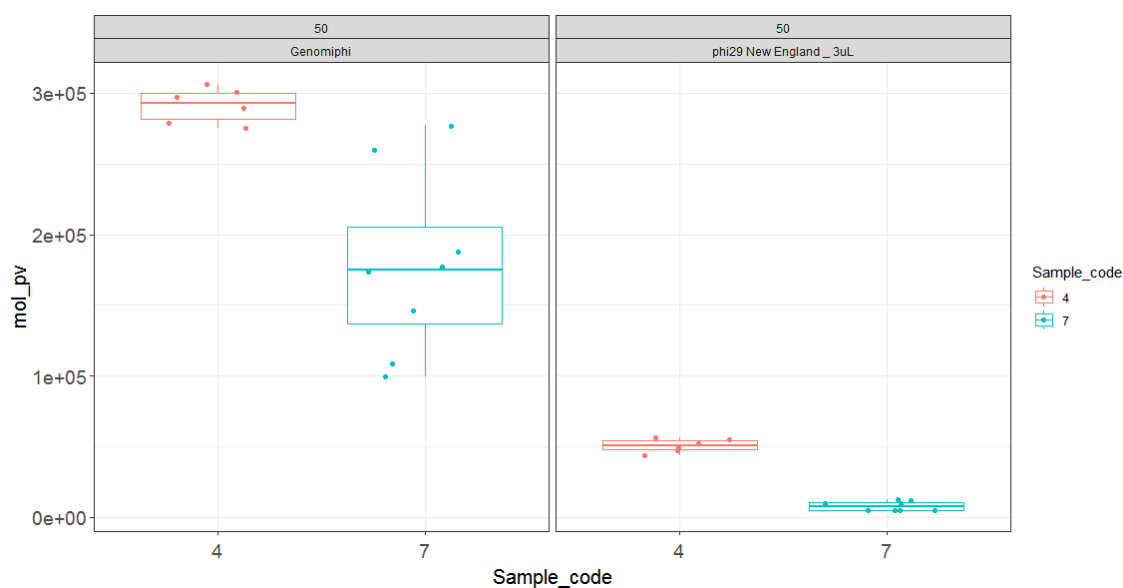


Figura 40. Cuantificación de ADN parasitario. Concentración final de ADN parasitario (moléculas/ μ L) en el eje Y; y las muestras (4 y 7), cada una representada por un color distinto, en el eje X. Las concentraciones iniciales de las muestras 4 y 7 fueron 144 y 16 moléculas/ μ L, respectivamente.

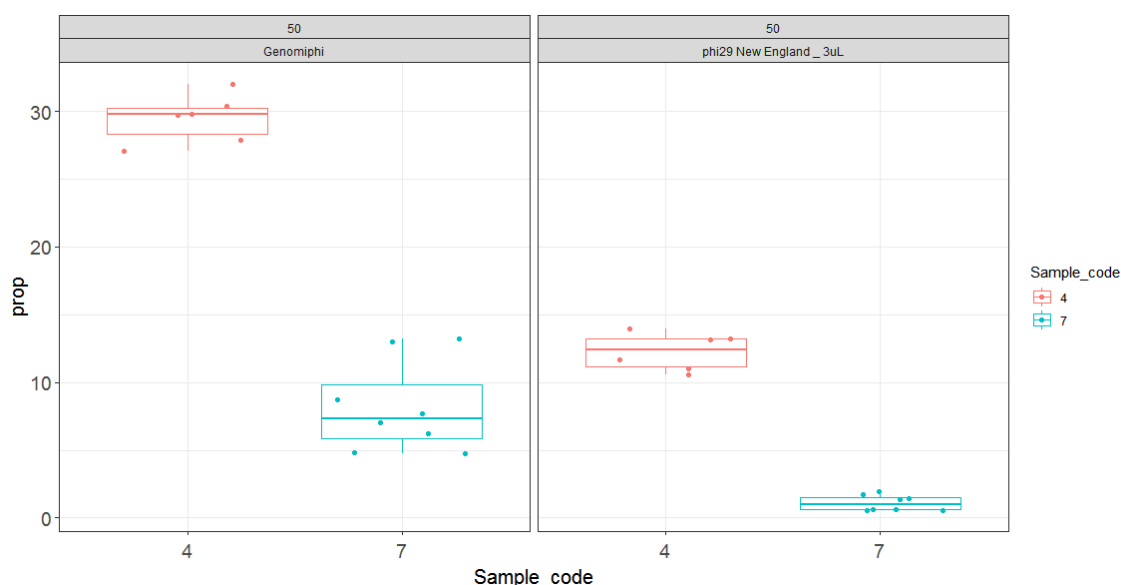


Figura 41. Porcentaje final de ADN parasitario (%) en el eje Y; y las muestras, cada una representada por un color distinto, en el X. Los porcentajes iniciales de las muestras 4 y 7 fueron 0.234 y 0.023 %, respectivamente.

Tabla 18. Estadístico de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon entre los diferentes grupos para la concentración (moléculas/ μ L) y porcentaje final de ADN parasitario (%). Las regiones sombreadas indican diferencia significativa.

ADN parásito (moléculas/ μ L)		Mayor	
		phi29_3uL	GenomiPhi
Menor	phi29_3uL	x	6.10E-05
	GenomiPhi	1	x
ADN parásito (%)		Mayor	
		phi29_3uL	GenomiPhi
Menor	phi29_3uL	x	6.10E-05
	GenomiPhi	1	x

11.2.12. Comparación de rondas de consecutivas y el efecto de la dilución de los productos SWGA

11.2.12.1. Juegos de set de cebadores en dos rondas SWGA

Se observó que una primera ronda con el pvset1920 y una segunda ronda de SWGA con el pvset1 generaba mayor concentración final de ADN parasitario que aquel juego de cebadores que solo usaba el pvset1920 (~1.61 veces más, con la excepción de la muestra 8 que presentó ~2.43 veces menos; figura 42, tabla 19). Comparación entre otros grupos no mostraron diferencias significativas. Respecto al porcentaje final, solo el juego pvset1-pvset1920 disminuyó significativamente comparado con los juegos de cebadores pvset1920-pvset1 (~1.47 veces menos, a excepción de la muestra 8 que fue ~1.17 veces más) y pvset1920-pvset1920 (~1.46 veces menos; figura 43, tabla 19).

11.2.12.2. Diluciones del producto de la primera ronda SWGA

Habiendo elegido el juego de cebadores pvset1920-pvset1, se determinó que haciendo una dilución de 1 en 50 del producto SWGA de la primera ronda fue mayor estadísticamente respecto a la dilución 1 en 10, ya sea en la concentración como el porcentaje final de ADN parasitario (~1.59 y ~2.13 veces más respectivamente; figura 42 y 43: tercera y cuarta columna, tabla 20). Sin embargo, fue solo con la muestra 8 que sucedió lo contrario, determinándose que a dilución 1 en 10 se obtuvo ~4.15 veces más de concentración final y ~2.06 veces más de porcentaje final que la dilución 1 en 50 (Figura 42 y 43).

11.2.12.3. 1° ronda vs 2° ronda SWGA

Teniendo en cuenta el juego de cebadores pvset1920-pvset1, se observó que luego de someterse a una 2° ronda SWGA se disminuye significativamente la concentración final de ADN parasitario respecto a la 1° ronda (~1.58 veces menos; figura 42: tercera y quinta columna, tabla 21); sin embargo, el porcentaje final aumenta significativamente (~3.11 veces más; figura 43: tercera y quinta columna, tabla 21).

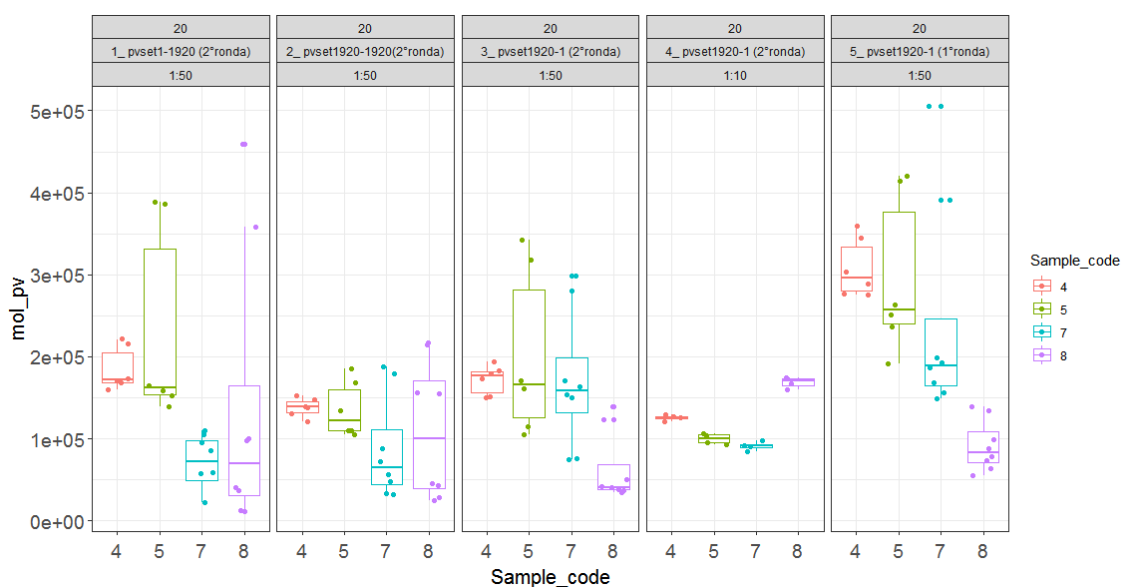


Figura 42. Cuantificación de ADN parasitario. Concentración final de ADN parasitario (moléculas/ μ L) en el eje Y; y las muestras (4, 5, 7, y 8), cada una representada por un color distinto, en el eje X. Las concentraciones iniciales de las muestras 4, 5, 7 y 8 fueron 329, 90, 33 y 8 moléculas/ μ L, respectivamente.

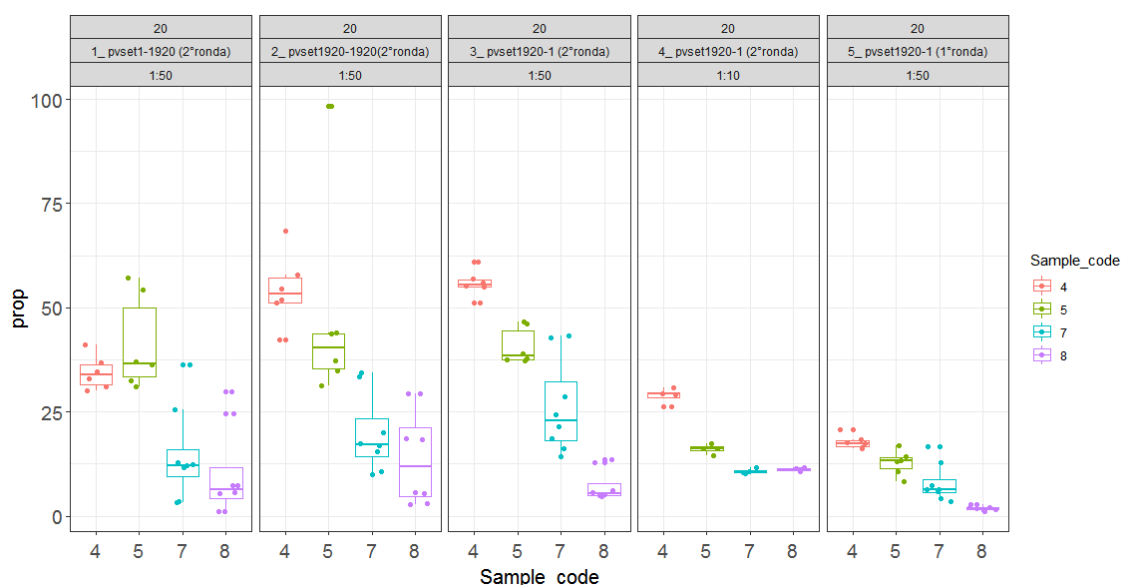


Figura 43. Porcentaje final de ADN parasitario (%) en el eje Y; y las muestras, cada una representada por un color distinto, en el X. Los porcentajes iniciales de las muestras 4, 5, 7 y 8 fueron 0.659, 0.171, 0.064, y 0.017 %, respectivamente.

Tabla 19. Estadístico de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon entre los diferentes grupos para la concentración (moléculas/ μ L) y porcentaje final de ADN parasitario (%). Las regiones sombreadas indican diferencia significativa.

ADN parásito (moléculas/ μ L)		Mayor		
		pvset1920-1920	pvset1920-1	pvset1-1920
Menor	pvset1920-1920	x	0.04283	0.05463
	pvset1920-1	0.9593	x	0.6272
	pvset1-1920	0.9479	0.382	x
ADN parásito (%)		Mayor		
		pvset1920-1920	pvset1920-1	pvset1-1920
Menor	pvset1920-1920	x	0.4509	0.9761
	pvset1920-1	0.5579	x	0.9965
	pvset1-1920	0.02525	0.003815	x

Tabla 20. Estadístico de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon entre los diferentes grupos para la concentración (moléculas/ μ L) y porcentaje final de ADN parasitario (%). Las regiones sombreadas indican diferencia significativa.

ADN parásito (moléculas/ μ L)		Mayor	
		50pvset1920-1	10pvset1920-1
Menor	50pvset1920-1	x	0.9927
	10pvset1920-1	0.007633	x
ADN parásito (%)		Mayor	
		50pvset1920-1	10pvset1920-1
Menor	50pvset1920-1	x	1
	10pvset1920-1	5.20E-06	x

Tabla 21. Estadístico de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon entre los diferentes grupos para la concentración (moléculas/ μ L) y porcentaje final de ADN parasitario (%). Las regiones sombreadas indican diferencia significativa.

ADN parásito (moléculas/ μ L)		Mayor	
		1pvset1920-1	2pvset1920-1
Menor	1pvset1920-1	x	1
	2pvset1920-1	2.61E-08	x
ADN parásito (%)		Mayor	
		1pvset1920-1	2pvset1920-1
Menor	1pvset1920-1	x	3.73E-09
	2pvset1920-1	1	x

11.2.13. Efecto de la enzima de restricción FspEI

No se observó diferencia significativa entre usar o no usar enzima de restricción, ya sea para la concentración (Figura 44, tabla 22) o porcentaje final de ADN parasitario (Figura 45, tabla 22).

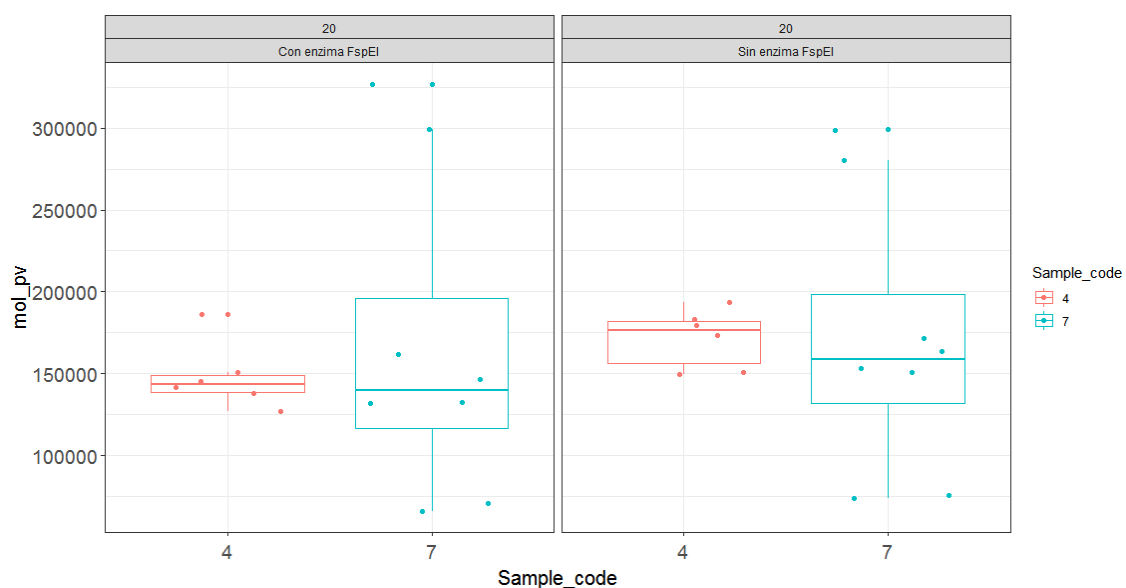


Figura 44. Cuantificación de ADN parasitario. Concentración final de ADN parasitario (moléculas/ μ L) en el eje Y; y las muestras (4 y 7), cada una representada por un color distinto, en el eje X. Las concentraciones iniciales de las muestras 4 y 7 fueron 329 y 33 moléculas/ μ L, respectivamente.

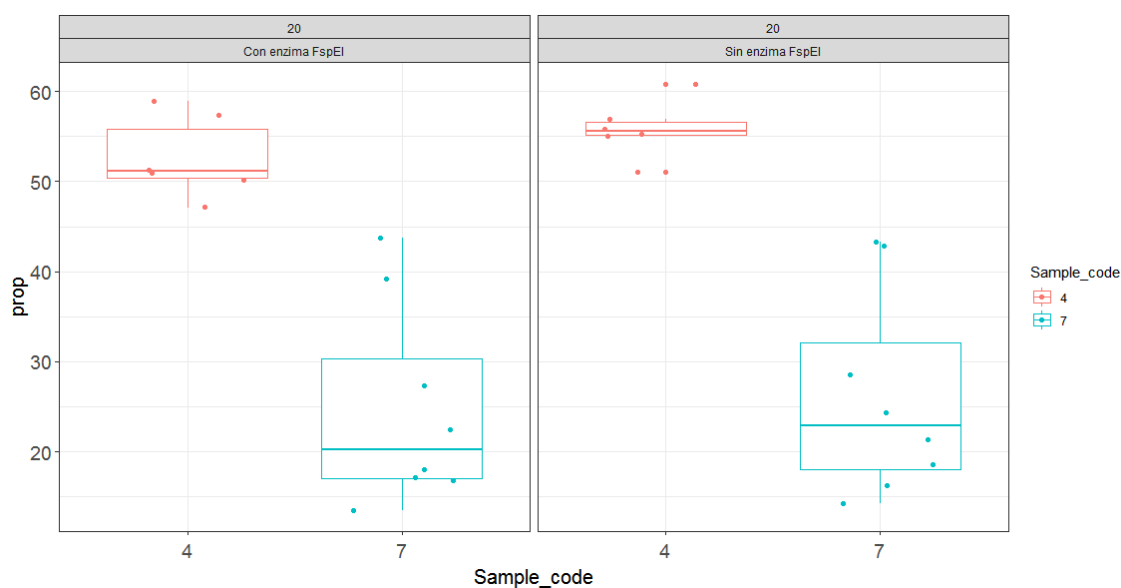


Figura 45. Porcentaje final de ADN parasitario (%) en el eje Y; y las muestras (4 y 7), cada una representada por un color distinto, en el X. Los porcentajes iniciales de las muestras 4 y 7 fueron 0.659 y 0.064 %, respectivamente.

Tabla 22. Estadístico de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon entre los diferentes grupos para la concentración (moléculas/ μ L) y porcentaje final de ADN parasitario (%). Las regiones sombreadas indican diferencia significativa.

ADN parásito (moléculas/ μ L)		Mayor	
		Sin enzima	Con enzima
Menor	Sin enzima	x	0.9137
	Con enzima	0.09686	x
ADN parásito (%)		Mayor	
		Sin enzima	Con enzima
Menor	Sin enzima	x	0.7684
	Con enzima	0.2508	x

11.2.14. Comparación cebadores específicos y no específicos

Se determinó claramente que con nuestros parámetros se obtuvo mayor producción significativa del ADN parasitario respecto al protocolo original del kit, tanto para la concentración (>35.13 veces más; figura 46, tabla 23) como el porcentaje final (>135.75 veces más; figura 47, tabla 23).

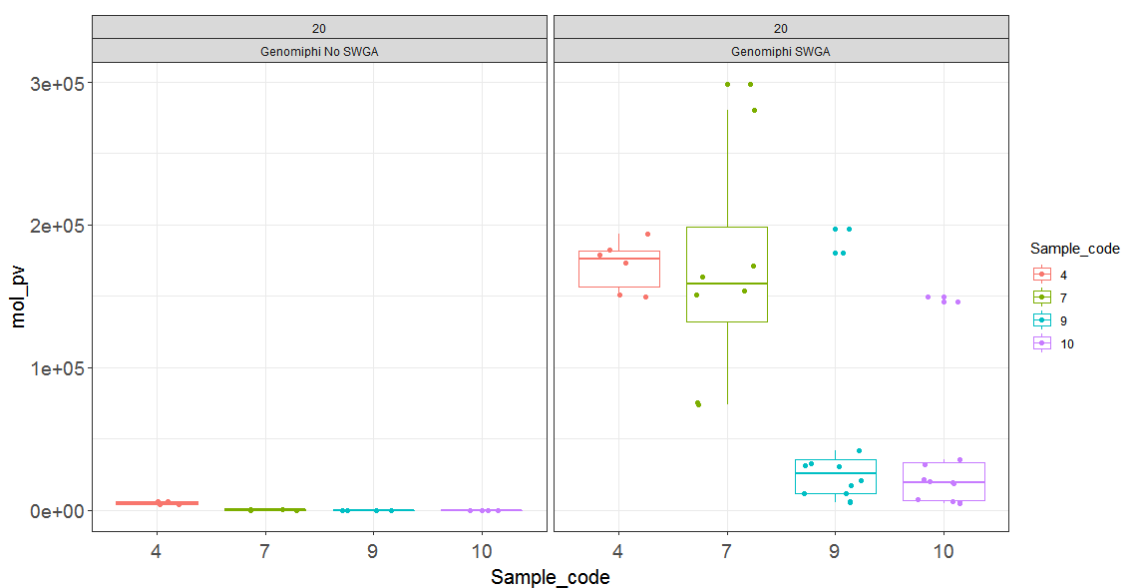


Figura 46. Cuantificación del ADN parasitario. Concentración final de ADN parasitario (moléculas/ μ L) en el eje Y; y las muestras (4, 7, 9 y 10), cada una representada por un color distinto, en el eje X. Las concentraciones iniciales de las muestras 4, 7, 9 y 10 fueron 219, 27, 4 y 1 moléculas/ μ L, respectivamente.

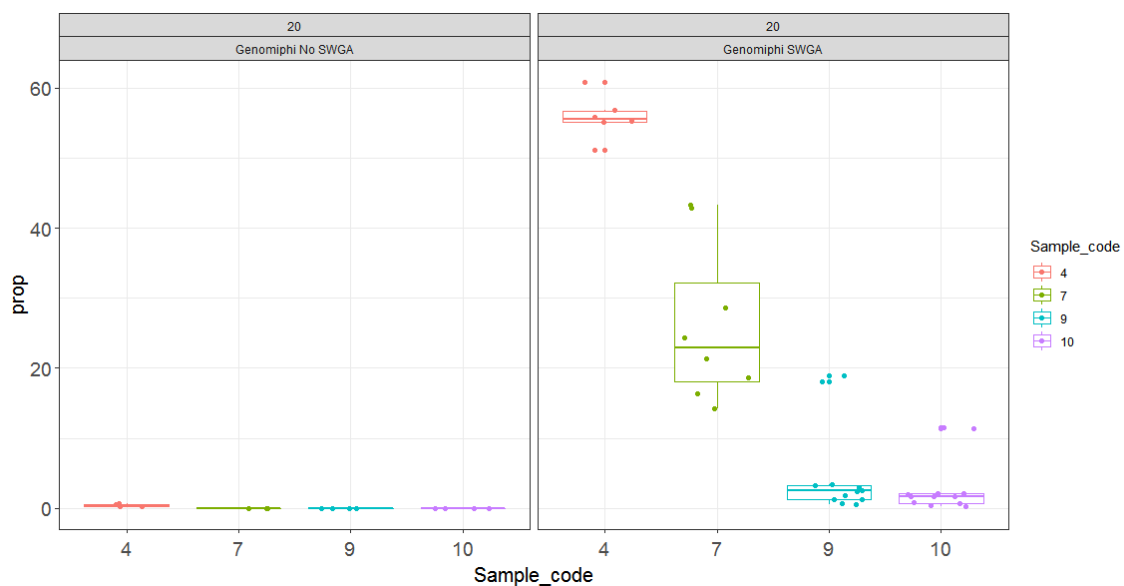


Figura 47. Porcentaje final de ADN parasitario (%) en el eje Y; y las muestras, cada una representada por un color distinto, en el X. Los porcentajes iniciales de las muestras 4, 7, 9 y 10 fueron 0.254, 0.034, 0.005 y 0.002 %, respectivamente.

Tabla 23. Estadístico de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon entre los diferentes grupos para la concentración (moléculas/ μ L) y porcentaje final de ADN parasitario (%). Las regiones sombreadas indican diferencia significativa.

ADN parásito (moléculas/ μ L)		Mayor	
		GenomiPhi _ No SWGA	GenomiPhi _ SWGA
Menor	GenomiPhi _ No SWGA	x	5.68E-14
	GenomiPhi _ SWGA	1	x
ADN parásito (%)		Mayor	
		GenomiPhi _ No SWGA	GenomiPhi _ SWGA
Menor	GenomiPhi _ No SWGA	x	5.68E-14
	GenomiPhi _ SWGA	1	x

11.3. Repetitividad de los ensayos SWGA

El desempeño del SWGA optimizado en las mismas muestras y mismos parámetros (a excepción del volumen final de reacción SWGA), pero en diferentes tiempos de realizarse el proceso, ha sido distinto (Figuras 48 y 49). No se pudo realizar alguna comparación directa entre dos resultados si es que no se había realizado la amplificación genómica en el mismo tiempo.

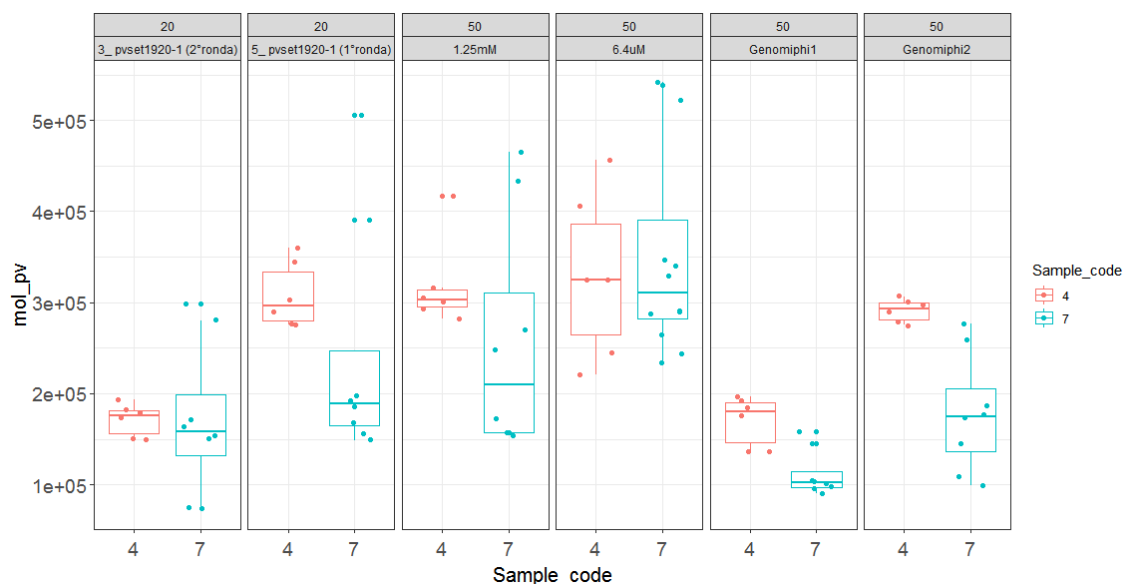


Figura 48. Concentración final de ADN parasitario (moléculas/ μ L) en el eje Y; y las muestras (4 y 7), cada una representada por un color distinto, en el eje X.

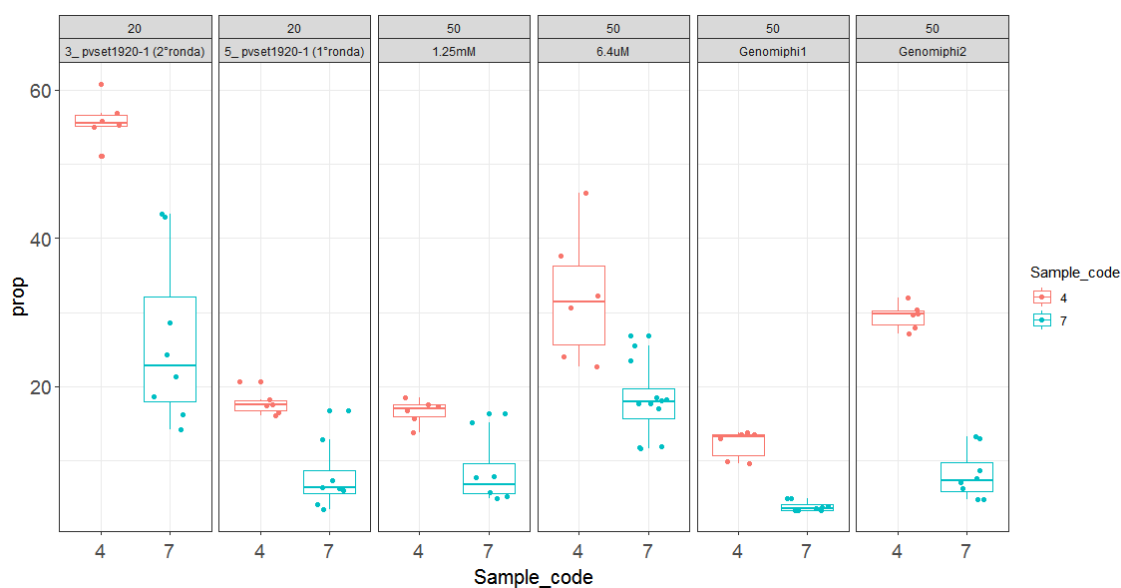


Figura 49. Porcentaje final de ADN parasitario (%) en el eje Y; y las muestras (4 y 7), cada una representada por un color distinto, en el X.

11.4. Integridad de los productos SWGA

11.4.1. 20 muestras de campo: 2° ronda SWGA

Se realizó una corrida electroforética a los productos SWGA de la 2° ronda en las 20 muestras utilizadas para el análisis de fidelidad. Se observó que todas presentaron presencia de ADN, habiendo en todos barrido. En ciertas muestras el barrido fue mucho mayor respecto a otras, por ejemplo, la muestra 6 fue la que presentó menos barrido y cuya banda correspondió a un tamaño entre 23 y 9 Kb (Figura 50). El ladder correspondió al ADN fago lambda digerido con Hind III cuyas bandas fueron de 23, 9, 6, 2.3, 2.0, 0.5, 0.1 Kb (Figura 50, Lad). El blanco de reacción, el cual contuvo todos los componentes de la amplificación genómica a excepción de ADN, presentó también ADN.

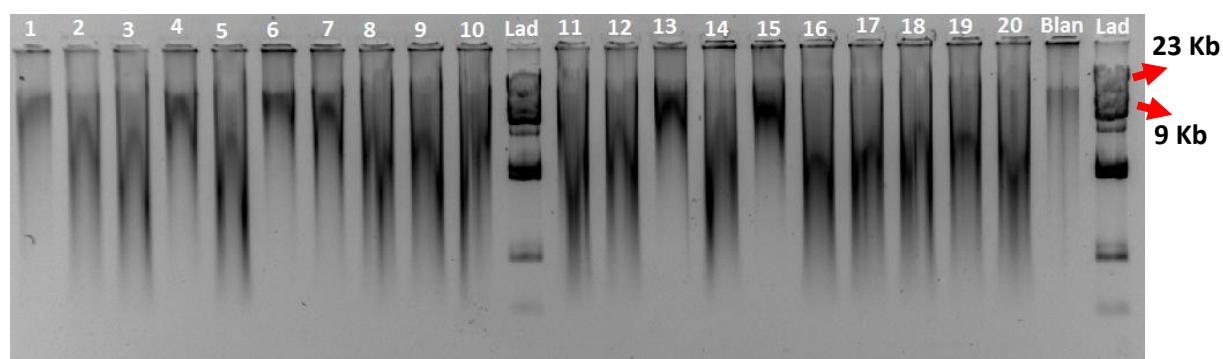


Figura 50. Corrida electroforética de 5 μ L del producto SWGA de la 2° ronda en 20 muestra reales, más el blanco de reacción (Blan), y el ADN phago Lambda digerido con Hind III (Lad). Concentración inicial de las 20 muestras en la tabla 6.

11.4.2. Panel de muestras (simuladas): 1° y 2° ronda SWGA

Se realizó una corrida electroforética a los productos SWGA de la 1° y 2° ronda de las muestras del 4 al 11. Se observó presencia de ADN en todas las muestras, incluidas el control de reacción SWGA que tenía todos los componentes a excepción del ADN. La mayoría de las muestras presentaron una banda notoria de un tamaño alrededor de 23 Kb, ya sea si fuese producto de la 1° o 2° ronda (Figura 51). Algunas muestras presentaron barrido más pronunciado, por ejemplo, los productos de las muestras 9 (2° ronda), 10 (1° ronda), 11 (2° ronda).

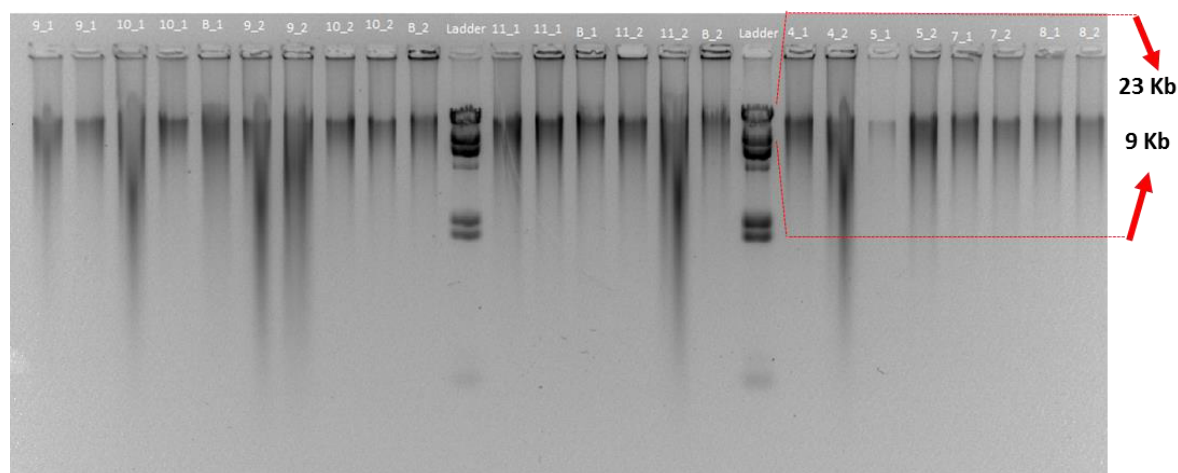


Figura 51. Corrida electroforética de 5 μ L del producto SWGA de la 1° y 2° ronda en las muestras (4 al 10), más sus respectivos blancos de reacción (B_1 y B_2), y el ADN phago Lambda digerido con Hind III (Lad). Muestras 4, 5, 7, 8, 9, 10, y 11 (329, 90, 33, 8, 4, 1 y 0.7 moléculas/ μ L, respectivamente).